

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

В. В. РОГОЖИН

П Е Р О К С И Д А З А К А К К О М П О Н Е Н Т А Н Т И О К С И Д А Н Т Н О Й С И С Т Е М Ы Ж И В Ы Х О Р Г А Н И З М О В



В. В. Рогожин

**ПЕРОКСИДАЗА
КАК КОМПОНЕНТ
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ**



2004

УДК 577.158.52
ББК 28.57
Р 57

Рецензенты

кандидат химических наук, доцент А. Г. Дранаева
кандидат химических наук, с.н.с. А. А. Попов

*Рекомендовано к печати Ученым советом
Якутской государственной сельскохозяйственной академии.*

Рогожин В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы
Р 57 живых организмов. — СПб.: ГИОРД, 2004. — 240 с.
ISBN 5-901065-80-8

В монографии рассматриваются структура и механизм действия гемсодержащих белков, а также топография их активных центров. Показано участие гемина в каталитическом процессе гемсодержащих белков. Приводятся данные по строению и механизму действия пероксидазы в реакциях оксидантного и пероксидазного окисления субстратов. Показана функциональная роль фермента в биологических системах, а также возможности его использования в аналитических исследованиях. Приводятся результаты исследований авторов, раскрывающие особенности протекания пероксидазных реакций с участием медленно и быстро окисляемых субстратов, а также роль индолил-3-уксусной кислоты в этих реакциях. Обсуждаются механизмы пероксидазных реакций индивидуального и совместного окисления фенолазинов и влияние строфангина G на кинетику их окисления. Установлена роль функционально важных групп активного центра пероксидазы, участвующих в катализе. Показано влияние моно- и олигосахаридов на каталитические свойства и стабильность пероксидазы. Представлена динамическая модель активного центра пероксидазы. Рассмотрено действие антиоксидантной системы растений и животных. Показаны условия протекания перекисного окисления липидов в живых организмах и роль пероксидазы в действии антиоксидантной системы растений. Изучено влияние малых доз ультрафиолетового облучения семян на состояние антиоксидантной системы, прорастающих зерновок пшеницы.

Предназначена для студентов старших курсов биологических специальностей, а также научных сотрудников и преподавателей университетов, медицинских, биологических и сельскохозяйственных институтов.

УДК 577.158.52
ББК 28.57
Р 57

ISBN 5-901065-80-8

© Рогожин В.В., 2004
© ЗАО ГИОРД, 2004

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АБТС	— 2,2'-азино-бис-(3-этил-бензтизолин-6-сульфонат)аммония.
АМ	— аминазин (2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазин).
Амид III	— N-этиламид <i>o</i> -сульфобензоилуксусной кислоты (EASBA).
АОС	— антиоксидантная система.
АОТ	— аэрозоль ОТ или натриевая соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты.
АК	— аскорбиновая кислота.
ВК	— викасол (2,3-дигидро-2-метил-1,4-нафтохинон-2-сульфата натрия).
ГХ	— гидрохинон.
ДГ	— дигоксин.
ДФК	— диоксифумаровая кислота.
КВ	— кверцетин.
ИУК	— индолил-3-уксусная кислота.
НА	— норадреналин (1-(3,4-диоксифенил)-2-аминоэтанол).
ОДН	— <i>o</i> -дианизидин (3,3'-диметоксибензидин или 4,4'-диамино-3,3'-ди-метоксибифенил).
ПАВ	— поверхностно активные вещества.
ПАБК	— <i>p</i> -аминобензойная кислота.
ПО	— пероксидаза.
ПОЛ	— перекисное окисление липидов.
РСА	— рентгеноструктурный анализ.
СОД	— супероксиддисмутаза.
ТМБ	— 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.
ТП	— тиопроперазин (2-диметилсульфамидо-10-{3-(1-метилпиперазинил-4)-пропил}-фенотиазин).
ТФ	— трифтазин (3-трифторметил-10-{3-(1-метилпиперазинил-4)-пропил}-фенотиазин).
ФК	— ферроцианид калия.
$W_0 = [H_2O]/[AOT]$	— степень гидратации мицелл АОТ в гептане.
СМЕ	— водорастворимый <i>n</i> -толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимид.
DG	— дигоксин.
DPP	— динитрофенилпропилендиамин.
DPG	— динитрофенилгексаметилендиамин.

DPD	— динитрофенилдодекандиамин.
EDP	— 1-этил-3(3-диметиламинопропил) карбодиимид.
GM	— гексаметилендиамин.
PDP	— иодметилат N-п-фенилазофенил-N'(N,N-диметиламинопропил) карбодиимид.
$k_{ин}$	— константа инактивации.
k_{cat}	— каталитическая константа.
K_m	— константа Михаэлиса.
K_i	— константа ингибирования.
K_s	— константа диссоциации ферментсубстратного комплекса.
V_m	— величина максимальной скорости ферментативной реакции.
ν	— начальная скорость ферментативной реакции.
$RO_2\cdot$	— перекисный радикал.
$R\cdot$	— радикал.
ROOH	— гидроперекись.
$O_2\cdot$	— супероксидный анион-радикал.
$HO_2\cdot$	— гидроперекисный радикал.
$OH\cdot$	— гидроксильный радикал.
1O_2	— синглетный кислород.
$RO\cdot$	— алкоксильный радикал.

ВВЕДЕНИЕ

*«Ели бы мы знали, что такое счастье,
то все были бы счастливы»*

*«Искать, то чего нет можно, только найти нельзя»
«Целое состоит из частей. Части составляют целое»*

Жизнеспособность организмов поддерживается за счет высокой активности антиоксидантной системы, в составе которой низко- и высокомолекулярные антиоксиданты. К группе низкомолекулярных антиоксидантов (НМА) относятся аскорбиновая кислота, гидрохинон, мочеви́на, аминокислоты, стероиды и др. По механизму проявляемого действия НМА подразделяются на соединения, обладающие антирадикальной и антиоксидантной активностью (Бурлакова и др., 1975). Однако их объединяет то, что все они являются донорами атомов водорода и электронов и поэтому участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Роль антиоксидантов сводится к тому, что в низких концентрациях они способны инициировать свободнорадикальные процессы, проявляя при этом прооксидантные свойства. Тогда как при избытке они подавляют образование свободных радикалов в живых организмах, проявляя антиоксидантные свойства. Соединения, обладающие высокой прооксидантной активностью, способны разрушать биогенные системы и поэтому являются основным инструментом апоптоза — запрограммированной смертью клеток живого организма. В образовании свободных радикалов принимает участие кислород, используемый в живых системах преимущественно в процессах окислительного фосфорилирования. Основную роль в образовании активных форм кислорода в живых организмах выполняют гемсодержащие белки, в составе которых железо в комплексе с протопорфирином IX. Эти белки выполняют самую разнообразную функцию в биогенных системах. Одни из них способны переносить кислород (гемоглобин и миоглобин), другие катализируют окислительно-восстановительные реакции (каталаза, пероксидаза, цитохром с пероксидаза и др.). Однако эти белки объединяет то, что их мономерные субъединицы, обладают способностью катализировать перокси-

дазные реакции, в результате которых происходит восстановление перекиси водорода до воды, сопровождаемое окислением неорганического или органического соединения.

Интенсивность аэробных процессов в живых организмах может быть оценена по активности пероксидазы, которая совместно с СОД и каталазой входит в состав высокомолекулярных антиоксидантов живых организмов, предотвращающих разрушительное действие активных форм кислорода (Fridovich, 1986; Halliwell, 1982). Пероксидаза способна катализировать реакции окисления различных биологически активных веществ (НАДН, ИУК, аскорбиновая кислота, флавоноиды и др.), среди которых следует выделить антиоксиданты — соединения, способные подавлять образование свободных радикалов, ингибировать ПОЛ. Таким образом, между пероксидазой и антиоксидантами должна наблюдаться взаимная зависимость, которая, к сожалению, недостаточно изучена, как и роль пероксидазы в этих процессах.

В живых организмах существует физиологически нормальный уровень свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов, необходимый для регулирования липидного состава, проницаемости мембран, и ряда биосинтетических процессов (Бурлакова и др., 1991). В генерировании свободных радикалов в биогенных системах может принимать участие и пероксидаза. Однако, несмотря на многолетние исследования фермента, полностью раскрыть его роль в биогенных системах пока не удается. Это во многом связано с тем, что слабо изученным является механизм действия фермента и, в особенности, устройство активного центра пероксидазы. Поэтому в этой работе мы постарались раскрыть механизм действия пероксидазы, а также роль фермента в составе антиоксидантной системы живых организмов, обобщая как литературные, так и собственные исследования.

Автор выражает искреннюю благодарность докторам химических наук Н.Н. Угаровой и Г.Д. Кутузовой (Московский государственный университет), а также сотрудникам лаборатории исследования биологически активных веществ ЯГСХА: Т.Т. Курилюк, В.В. Верхотурову, Т.В. Рогожиной и О.В. Соколовой.

ГЕМСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ, КАТАЛИЗИРУЮЩИЕ ПЕРОКСИДАЗНЫЕ РЕАКЦИИ

1.1. СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

Гембелки представляют собой класс белков и ферментов, главной функциональной частью которых является железосодержащий протопорфирин IX. Эти белки обладают различными функциями и механизмом действия [Ком, 1978]. Одни из них способны обратимо связывать кислород, транспортируя его к различным органам и тканям организма (гемоглобин), другие запасают кислород в связанном виде (миоглобин). Гембелки катализируют окисление или переокисление различных соединений кислородом (цитохром P₄₅₀ и пероксидазы), участвуют в процессах переноса электронов (цитохромы b и c), катализируют разложение гидроперекисей (каталаза), восстановление кислорода до воды (цитохром c оксидаза). Приставки геми- и гемо- происходят от названий железопорфириновых группировок, при этом железо (II) порфириновый комплекс называют гемом, а железо (III) порфирин — гемином.

Различные гемопротеины отличаются как строением полипептидных цепей, так и структурой порфириновой части [Falk, 1967; Degli, 1989; Andersson, Dawson, 1991; Austin et al., 1993]. Свойства гемопротеинов существенно зависят от структуры входящих в их состав порфиринов, аксиальных лигандов, состояния окисления центрального атома и природы белкового окружения [Евстигнеева и др., 1995; Степура и др., 1997; Моисеева, Постникова, 2001]. Полную информацию о строении и механизме действия гембелков можно получить, если использовать результаты целого комплекса различных методов исследования: рентгеноструктурного анализа, электронной спектроскопии в видимой и УФ-области, спектров КД и ДОВ, ЯМР- и ЭПР- спектроскопии, кинетических и биохимических характеристик, компьютерные методы и др. [Bearden, Dunham,

1970; Kitagawa, Ozaki, 1987; Armstrong, 1988; Austin et al., 1993; Henry et al., 1993; Cupane et al., 1995]. Мы провели сравнительный анализ строения активных центров и механизм действия гемоглобина, миоглобина, каталазы, цитохром с пероксидазы и цитохрома с, являющихся родственными пероксидазе гембелками. Сравнение первичной аминокислотной последовательности, а также рентгеноструктурные данные показывают наличие у этих гембелков схожего с пероксидазой лигандного окружения в области железа гема как с проксимальной, так и с дистальной стороны [Welinder, Mazza, 1977; Долманова, Угарова, 1980]: гем располагается в складке, образованной гидрофобными остатками полипептидной цепи, а его пропионовокислые остатки направлены к поверхности белковой глобулы и участвуют главным образом в стабилизации третичной структуры и правильной ориентации гема на белке за счет образования водородных связей с боковыми аминокислотными остатками. Анализ литературы дает возможность предположить, что такое расположение гема типично для большинства гембелков.

Вследствие сходства в строении активных центров гембелки могут катализировать некоторые пероксидазные реакции [Keilin, Hartree, 1955]. Так известно, что мономерная субъединица каталазы способна участвовать в реакциях окисления субстратов перекисью водорода, утрачивая при этом каталазную активность. Сама же каталаза, т.е. ее тетрамер, может проявлять только умеренную пероксидазную активность. Гемоглобин и миоглобин в реакции с перекисью водорода образуют промежуточные соединения аналогичные, как было показано в работах [Keilin, Hartree, 1955; Пратт, 1978], промежуточным соединениям пероксидазы. Поэтому они могут катализировать пероксидазные реакции, однако скорость этих реакций значительно медленнее, чем у пероксидазы [Keilin, Hartree, 1955]. Причем метмиоглобин в пероксидазных реакциях окисления ABTS был в 2,7 раза активнее, чем метгемоглобин [Метелица и др., 2001]. Значения каталитических констант для метмиоглобина ($0,021 \text{ с}^{-1}$) и метгемоглобина ($0,0105 \text{ с}^{-1}$) намного уступали их величинам для пероксидаз [Метелица, 1984], но были близки с каталитическими константами окисления о-фенилендиамина с участием гема ($0,013 \text{ с}^{-1}$) или ТМБ с участием гема ($0,017 \text{ с}^{-1}$) и метгемальбумина ($0,016 \text{ с}^{-1}$). По каталитической активности в пероксидажном окислении аминов предлагается в следующем порядке расположить гемсодержащие биокатализаторы [Метелица и др., 2001]: пероксидазы >>

ферритин > > метмиоглобин > метгемоглобин > метгемальбумин > гемин. В ходе каталитического процесса отмечалась частичная деструкция биокатализатора радикалами, образующимися при разложении H_2O_2 [Метелица, 1984; Еремин и др., 1996; Заводник, Лапшина, 1996]. В работе [Степуро и др., 1997] показано, что кислородные свободные радикалы и пероксид водорода вызывают повреждение белковой глобулы гемоглобина, высвобождение гемина, ионов $Fe(III)$ и расщепление порфиринового кольца. Деструкция гембелков, возможно, вызвана отсутствием поверхностных систем защиты белковых глобул, которые выполняют углеводы у пероксидазы, покрывающие апобелок снаружи.

Структуры активных центров гемоглобина, миоглобина и каталазы являются более высокоорганизованными по сравнению с пероксидазой, т.к. их активные центры предназначены в основном для выполнения специфических функций в организме человека [Пратт, 1978]. Однако, несмотря на высокую структурную организацию, эти гемсодержащие белки сохранили способность участвовать в реакциях окисления, что, возможно, позволяет в ряде случаев использовать специализированные ферментные системы в окислительных реакциях, реализуемых при включении механизмов саморазрушения клеток, т.е. в механизмах апоптоза, участвуя в активизации механизмов перекисного окисления липидов в биогенных системах [Trost, Wallace, 1994]. Поэтому выявление общих закономерностей в строении активных центров и механизмов действия гемсодержащих белков поможет понять специфику их действия и, в частности, механизм действия пероксидазы и других гембелков в составе антиоксидантной системы.

1.2. ТОПОГРАФИЯ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

Строение активных центров гемсодержащих белков предопределяется уникальным расположением аминокислотных остатков в области активного центра, что обеспечивает возможность выполнять присущие им функции [Пратт, 1978]. Гемоглобин, миоглобин, каталазу, пероксидазу и цитохром с пероксидазой объединяет то, что каталитически активной группой у них является протопорфирин IX, содержащий Fe^{2+} или Fe^{3+} , а также схожее лигандное окружение вблизи гема. Гемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb) не яв-

ляются ферментами, а осуществляют транспорт кислорода и обратный транспорт CO_2 . Связывание O_2 и CO этими белками сходно со связыванием этих субстратов ферропероксидазой [Yamada, Yamazaki, 1975], т.е. с фермент-субстратным связыванием, а ферригемоглобин образует комплекс с цианидом, спектрально сходный с комплексом феррипероксидазы с цианидом [Ком, 1978]. Отличительной особенностью Мв и Нв является то, что эти гем-белки связывают кислород, не подвергая его химическому превращению, а образуют устойчивый комплекс, в котором O_2 занимает шестое координационное положение. Миоглобин отличается от гемоглобина тем, что первый является мономерным белком [Padlan, Love, 1971], тогда как Нв состоит из четырех субъединиц (двух α и двух β). Субъединицы Нв имеют сходную с Мв третичную структуру, но различаются по родству к кислороду, что, вероятно, связано с различием в строении белковой части активных центров этих гембелков. Миоглобин и каждая субъединица гемоглобина содержат один гем. Атом железа в оксигемоглобине расположен в плоскости порфиринового кольца, а в высокоспиновом дезоксигемоглобине — выступает на $0,8 \text{ \AA}$ в направлении белкового лиганда, и координационное число его равно пяти. Гем расположен внутри складки или «кармана», образуемого белковой цепью [Kendrew, 1963; Gregoriou et al., 1995]. С проксимальной стороны, в цепи гемоглобина, с железом гема координирован His-92, а в дистальной области расположен His-63. Наличие Val-67 и Phe-42 вблизи His-63 придает активному центру этих гембелков гидрофобный характер [Perutz et al., 1968; Jayaraman et al., 1994; Abadan et al., 1994]. В гемоглобине связывание лигандов в области гема может происходить как с проксимальной, так и с дистальной стороны [Ком, 1978]. Однако каталитически активной является только дистальная область гема, где происходит связывание O_2 , CO , CO_2 и других лигандов небольшого размера. Связывание лигандов приводит к структурным изменениям пространственного расположения цепей гемоглобина [Muirhead et al., 1967], что подтверждено кристаллографически [Perutz et al., 1968].

Несмотря на сходство в строении активных центров, Нв и Мв выполняют несколько разные функции. Нв осуществляет перенос O_2 , Мв — запасает кислород. У них несколько отличается и редокс-потенциал (табл. 1), что, по-видимому, обуславливает специфичность выполняемых ими функций. Так как лигандное окружение гема у Мв и Нв одинаково, то различие в редокс-по-

Таблица 1

Аминокислотные остатки белка, входящие в состав координационной сферы железа гема и редокс-потенциал гембелков

Белок	Проксимальный лиганд	Дистальная область	E°, В	Валентное состояние железа	Наличие воды в координационной сфере железа	Координационное число железа гема	Литература
Гемоглобин	Гистидин	Гистидин, валин	+0,2	+2	Есть	5	Ком, 1978; Re-tutz et al., 1968
Миоглобин	Гистидин	Гистидин, валин	+0,05	+2	Есть	5	Ком, 1978
Пероксидаза хрена	Гистидин	Гистидин, аспарагиновая кислота	-2,5	+3	Нет	5	Угарова и др., 1981; Прагг, 1978; Yamada et al., 1975
Цитохром с пероксидаза	Гистидин	Гистидин, триптофан, аргинин	-0,194	+3	Есть	6	Conroy et al., 1978; Poulsen et al., 1980
Каталаза	Тирозин	Гистидин	-	+3	Нет	5	Murthy et al., 1981

тенциалах может быть связано с изменением длины связи и валентного угла между железом гема и проксимальным гистидином, вызванным различными взаимодействиями между близко расположенными аминокислотными остатками полипептидной цепи апобелка.

На примере мутантных форм гемоглобина видно сколь существенные изменения происходят в структуре белка и его сродстве к O_2 при замене только одного остатка аминокислоты в полипептидной цепи. Так, замена His-87 α цепи, являющегося пятым лигандом гема в Мв и в каждой субъединице Нв, на менее основной остаток тирозина приводит к тому, что аномальные субъединицы утрачивают способность обратимо связывать кислород и вместо этого окисляются [Hayashi et al., 1966]. Это обусловлено изменением положения гема по отношению к плоскости порфиринового кольца и, следовательно, свидетельствует об участии пятого лиганда в этом искажении. Замещение дистальных His-58, 63 на тирозин в α цепи или в β цепи Нв приводит к тому, что кислород не связывается субъединицами, а окисляет Fe^{2+} до Fe^{3+} [Gelad, Efron, 1961]. Окисленное состояние железа в гемоглобине, как было показано [Perutz, Lehmann, 1968], может стабилизироваться ионной связью между Fe^{3+} и введенным тирозином. Это один из важных фактов, с помощью которого можно объяснить образование стабильного Fe^{3+} в каталазе, у которой проксимальным лигандом тоже является тирозин [Murthy et al, 1981]. Однако для пероксидазы эту аналогию провести нельзя, т.к. у нее проксимальным лигандом железа (III) гема является гистидин [Ishimaru, 1980]. По-видимому, стабилизация Fe^{3+} состояния пероксидазы обусловлена другими причинами.

Замещение дистального His-63 на аргинин в β субъединице гемоглобина в отличие от вышеприведенного случая увеличивает его сродство к кислороду [Winterhalter, 1969] вследствие того, что аргинин больше по объему, чем тирозин, и не может расположиться в лигандном «кармане» [Perutz, Lehmann, 1968]. Это тоже является важным обстоятельством, поскольку расстояние между функциональными группами в области активного центра белка определяется геометрией расположения всех аминокислотных остатков полипептидной цепи, и поэтому замена даже одной аминокислоты приводит к резкому нарушению расположения функционально важных остатков относительно друг друга. Это, в свою очередь, нарушает конформацию активного центра белка и из-

меняет его субстратную специфичность. Замещение Val-67 в дистальной области β субъединицы Hb на глутаминовую или аспарагиновую кислоту [Gerald, Efron, 1961] приводит к тому, что карбоксильные группы этих аминокислот образуют солевые мостики и с железом гема, и с дистальным His-63 [Perutz, Lehmann, 1968]. Солевой мостик с железом гема может стабилизировать атом металла в окисленном состоянии и таким образом предотвращает его связывание с кислородом. Солевой мостик с гистидином стягивает гемовый «карман», существенно понижая сродство Hb к кислороду. Из этих примеров видно, что присутствие карбоксильной группы в дистальной области гема может стабилизировать Fe^{3+} состояние, что является важным фактом, т.к. у пероксидазы в дистальной области также предполагается наличие карбоксильной группы Asp-43. Однако ее роль в каталитическом действии фермента плохо изучена. На основании имеющихся данных трудно сказать, чем обусловлена стабильность состояния Fe^{3+} в пероксидазе, хотя на основании вышеизложенного, можно высказать предположение, что это осуществляется, возможно, за счет какой-то карбоксильной группы или какой-то другой группы, расположенной в активном центре фермента.

Каталаза и цитохром с пероксидаза так же, как и пероксидаза хрена, относятся к группе окислительно-восстановительных ферментов и являются близкородственными по механизму действия. Они способны реагировать с H_2O_2 , образуя промежуточные соединения, аналогичные промежуточным соединениям пероксидазы [Keilin, Hartree, 1951; Ronnberg et al., 1981]. Мономерная субъединица каталазы способна катализировать процессы пероксидазного окисления. Возможность выполнять некоторые функции пероксидазы обусловлена общностью в строении активных центров этих гембелков. Кроме того, для каталазы и цитохром с пероксидазы проведены рентгенографические исследования, позволившие определить геометрическое расположение и природу функциональных групп, входящих в состав активных центров этих ферментов [Finzel et al., 1984; Fita et al., 1986; Murshudov et al., 1992; Poulos et al., 1993; Gouet et al., 1995].

Рентгенографические данные показали, что в активном центре каталазы проксимальным лигандом железа гема является Тур-367, а в дистальной области располагаются Phe-167, His-74 и Asn-147 [Murthy et al., 1981]. Предполагают [Mincey, Traylor, 1979], что проксимальный лиганд каталазы может находиться в депротониро-

ванном состоянии и за счет этого стабилизировать ион железа гема в ферриформе. Атом азота дистального His-74 расположен на расстоянии 4,5 Å от атома железа, а его имидазольное кольцо располагается почти параллельно плоскости гема, на расстоянии 3 Å. Строение активного центра каталазы отличается от других гем-белков тем, что гемин очень глубоко погружен внутрь глобулы, поэтому субстраты могут проникать к активному центру каталазы, в область координационного окружения гема, только по каналу, имеющему максимальную ширину у входного отверстия 15 Å, где располагаются гидрофильные аминокислотные остатки Asn-127, Glu-167 и Lis-172 [Murthy et al., 1981]. Сам же канал имеет длину 30 Å и выстлан гидрофобными аминокислотными остатками (Val-73 и -115, Ala-116, Gly-117, Pro-128, Phe-152, -153, -160 и -163, Ile-164, Leu-148). Ограниченные размеры канала каталазы создают стерические затруднения для ее некоторых субстратов, что наглядно было показано еще Чансом [Chance, 1949a], который, используя перекиси с различными заместителями, заключил, что гем каталазы глубоко погружен внутрь белка. Через канал вглубь молекулы каталазы могут проникать кроме перекисей и достаточно больше молекулы, например, аминотриазол, являющийся необратимым ингибитором фермента. Он модифицирует His-74 и, встраиваясь в гемовый «карман», своим атомом азота образует координационную связь с железом гема, поэтому такая модификация приводит к полному ингибированию фермента [Reid et al., 1981].

Цитохром с пероксидаза имеет примерно одинаковый с пероксидазой хрена молекулярный вес, но не содержит углеводов [Paul et al., 1963]. Спектры поглощения ферри- и ферроформ этих гем-белков и ряда их производных, таких как ферри-цианид и ферро-СО очень похожи [Blumberg et al., 1968]. Оба фермента могут осуществлять окисление субстратов в присутствии гидроперекисей. Выполнение одинаковой функции объясняется схожестью строения активных центров этих гембелков (табл. 1). Так, проксимальным лигандом цитохром с пероксидазы является имидазол гистидина, а в дистальной области расположены триптофан, гистидин и аргинин [Poulos et al., 1980; McGinnity et al., 1996]. В шестом координационном положении в цитохром с пероксидазе по данным рентгеноструктурного анализа располагается молекула воды, которая образует водородную связь с дистальным гистидином боковой цепи (табл. 1). У пероксидазы хрена в координационной сфере железа гема нет молекулы воды [Lanir, Schejter, 1975]. Однако это

свойственно, по-видимому, только данному ферменту, т.к. резонанс-рамановские спектры пероксидазы из кишечника свиньи показывают, что в координационной сфере этого фермента присутствует молекула воды [Kimura et al., 1981].

Определение функциональной роли пропионовокислых остатков гема в гембелках имеет большое значение при изучении механизма их действия. Этот вопрос долгое время оставался спорным, т.к. было неясно: участвуют ли карбоксильные группы гема в каталитическом процессе или они важны только для стабилизации и ориентации гема на белке. В этом разделе на основании имеющихся данных рентгеноструктурного анализа и других методов исследования мы рассматриваем функциональную роль боковых остатков гема в различных гембелках.

Результаты рентгеноструктурного анализа белков показывают, что наблюдается закономерное расположение аминокислотных остатков полипептидной цепи таким образом, что заряженные группы, этого требует термодинамика, располагаются в основном на наружной стороне молекулы белка, а гидрофобные — внутри глобулы. Гемовая простетическая группа находится, как правило, внутри складки или «кармана», образованного полипептидной цепью [Ком, 1978]. Фиксация гема осуществляется за счет неполярных контактов с гидрофобными аминокислотными остатками белка, а также за счет водородных связей одного или двух пропионовокислых остатков гема с аминокислотными остатками апобелка. Ориентация гема в гемоглобине, миоглобине, цитохром с пероксидазе аналогична таковой в пероксидазе хрена: пропионовокислые остатки направлены к поверхности белковой глобулы, а винильные группы — внутрь. Причем, в гемоглобине кашалота карбоксильная группа в 6-ом положении порфирина образует водородную связь с атомом азота His-97 и направлена к проксимальной стороне порфиринового кольца, а карбоксильная группа в 7-ом положении образует аналогичный полярный контакт с Arg-45 [Макинен, 1978] и, следовательно, направлена к дистальной стороне. Образование контактов пропионовокислых групп в гемоглобине как с проксимальной, так и с дистальной стороны, обеспечивает жесткое закрепление гема, препятствующее изменению ориентации его в гемовом «кармане». В метгемоглобине только карбоксильная группа в 7-ом положении образует водородную связь с His-45 в α субъединице, с Ser-45 в β субъединице. Модификация пропионовокислых остатков гема в

гемоглобине не влияет ни на процесс оксигенирования, ни на его спектральные свойства [Sugita, Yoneyama, 1971]. Отличительной особенностью расположения гема в цитохром с пероксидазе является то, что гем размещается в «кармане» между двумя закрученными областями белковой глобулы, граничащими с двумя спиральными участками [Poulus et al., 1980]. «Карман» окружен алифатическими и ароматическими аминокислотными остатками, некоторые из которых находятся в контакте с гемовой группой. Гем удерживается в этом «кармане» за счет образования водородной связи между одной из пропионовокислых групп гема с треонином полипептидного участка, принадлежащего одной из антипараллельных β пар.

Направленность к поверхности белка карбоксильных групп гема наблюдается не во всех гембелках. Так, согласно результатам рентгеноструктурного анализа, у феррицитохрома с лошади они расположены на дне расщелины, образуемой полипептидной цепью, в которую упакован гем, и связаны водородными связями с аминокислотными остатками белка [Dickerson et al., 1971]. Одна из двух пропионовокислых групп цитохрома с более глубоко погружена в белковую глобулу и связана с водородными связями с тремя остатками: Tyr-48, Trp-59, Thr-40, а другая, расположенная ближе к поверхности молекулы, образует водородные связи с остатками Thr-49 или Asn-52.

В гемоглобине, миоглобине, цитохром с пероксидазе и пероксидазе хрена гем нековалентно связан с апобелком и его можно обратимо удалить [Maehly, 1952; Amiconi et al., 1972]. После реконструкции фермента полностью восстанавливается его каталитическая активность. Однако в случае каталазы это не удавалось сделать, что можно было объяснить несколько иным положением гемина на апобелке. Результаты рентгеноструктурного исследования каталазы показали, что гем глубоко погружен внутрь глобулы почти на 20 Å от поверхности белка и расположен в гидрофобном «кармане», который образован аминокислотными остатками двух различных субъединиц. Каждая из пропионовых кислот гема связана, как и в цитохроме с, водородными связями: одна — с Arg-71 и Arg-111, а другая образует связь с His-361 и Arg-364 [Murthy et al., 1981]. Рентгеноструктурные исследования большинства гембелков, как было показано выше, убедительно показывают, что пропионовокислые остатки гема в гембелках образуют водородные связи с аминокислотными ос-

татками полипептидной цепи. Поэтому трудно предположить чтобы они могли участвовать каким-то образом в каталитическом процессе. Однако данные рентгенографического исследования позволяют определять положение аминокислотных остатков только в статическом состоянии, поэтому их недостаточно для точного определения функциональной роли пропионовокислых остатков гема.

Одним из способов выявления роли карбоксильных групп в катализе является изучение свойств реконструированных гембелков с этерифицированными пропионовокислыми остатками гема. Однако такие исследования часто вносят путаницу, так как правильный ответ может быть получен только в том случае, если при реконструкции апобелка с модифицированным гемом образуется каталитически активная конформация нативного белка. Однако достичь этого очень трудно, т.к. при использовании модифицированных гемов часто нарушается структура активного центра фермента вследствие неправильной ориентации гема на апобелке. Этого можно избежать, если модифицировать пропионовокислые остатки гема непосредственно в нативном ферменте, выделить модифицированный гем, а затем проводить реконструкцию модифицированного гема с нативным апобелком и исследовать влияние модификации на каталитические свойства фермента. Таким способом можно определить число доступных модифицирующим агентам, т.е. расположенных близко к поверхности карбоксильных групп гема, и избирательно промодифицировать их как в 6-ом, так и 7-ом положениях, которые, по-видимому, в общем случае не эквивалентны.

1.3. УЧАСТИЕ ГЕМИНА В КАТАЛИТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

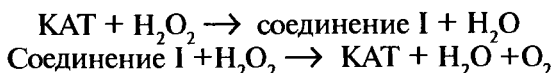
Каталитически активной группой, входящей в состав активного центра пероксидазы, каталазы и цитохром с пероксидазы, является гемин, содержащий трехвалентное железо. Поэтому данные ферменты могут катализировать пероксидазные процессы окисления. Реакция этих гембелков с перекисью водорода идет через образование нескольких промежуточных соединений, которые спектрально сходны и имеют близкие максимумы поглощения (табл. 2). Однако исследование этих промежуточных соединений методами ЭПР и ЭЯДР [Hanson et al., 1981; Blumberg,

Таблица 2

**Максимумы поглощения и значения молярных коэффициентов
поглощения пероксидазы, каталазы, цитохром с пероксидазы
и их промежуточных соединений с перекисью водорода**

Фермент и его промежуточные формы	Максимумы поглощения, нм (ε, мМ ⁻¹ см ⁻¹)		Литература
	полоса Сорэ	видимая область	
Пероксидаза хрена	403 (102)	498, 640 (11,25) (3,23)	Schonbaum, Lo, 1972
E ₁	400 (53,8)	525, 577, 622, 651	
E ₂	420 (105)	527, 554 (9,5) (9,65)	
E ₃	416	546, 583, 673	Keilin, Hartree, 1951
Каталаза печени лошади	405 (140)	506 пл, 544 пл, 629	Keilin, Hartree, 1951
E ₁	405 (30)	670	
E ₂	410 (26)	536, 572	
E ₃	416	545, 585	
Цитохром с пероксидаза	408 (93)	505, 535 пл, 645	Yonetani, 1970
E ₁	420	530, 561, 625	Yonetani, Asakura, 1968

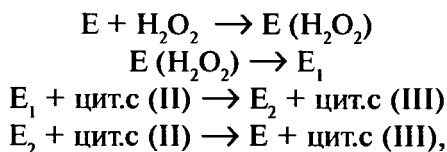
Peisach, 1968; Hoffman et al., 1981] показало, что их электронные структуры имеют как общие черты, так и различия. Для каталазы и пероксидазы перекись водорода является субстратом. Каталаза реагирует с перекисью с образованием трех соединений [Keilin, Hartree, 1951]. Лишь одно из них, соединение I, аналогично соединению I пероксидазы с H₂O₂, обладает высокой каталитической активностью и участвует в окислении различных органических соединений. Соединение II каталазы образуется только при действии избытка перекиси; его каталитическая активность приблизительно в 10⁴ раз меньше, чем активность соединения I. Кейлин и Хартти [Keilin, Hartree, 1951] обнаружили еще неактивное соединение III, образующееся в присутствии высоких концентраций перекиси водорода (табл. 2). Реакция каталазы с перекисью водорода отличается от аналогичной реакции пероксидазы. Каталаза осуществляет реакцию диспропорционирования, т.е. расщепляет перекись водорода до воды и O₂ в ходе одностадийной двухэлектронной реакции по схеме [Hanson et al., 1981]:



Пероксидаза катализирует реакцию восстановления перекиси водорода до воды с образованием двух промежуточных соединений E_1 и E_2 , причем процесс происходит в две последовательные одноэлектронные стадии [Chance, 1952].

В настоящее время считается доказанным, что соединение E_1 каталазы и пероксидазы содержат по два окислительных эквивалента: один на железе гема, имеющего электронную конфигурацию Fe (IV), а другой в виде π -катион радикала на порфирине [Hanson et al., 1981]. В работе [Browett, Stillman, 1981] была предложена электронная структура соединения E_1 отражающая механизм действия пероксидазы, в которой соединение E_1 существует в виде $O = Fe(IV)$ (феррильная конфигурация), а соединение E_2 в форме $OH - Fe(IV)$. Однако в работе [Hanson et al., 1981] было показано, что и соединение E_2 может иметь феррильную конфигурацию, которая в соединении E_1 сопряжена с π -катион радикалом порфиринового макроцикла. Механизмы пероксидазных реакций для пероксидазы и каталазы описаны [Hanson et al., 1981, Browett, Stillman, 1981].

Данные, полученные при изучении скорости реакции перекисного комплекса цитохром с пероксидазы с цитохромом с, который является субстратом данного фермента, показали, что эта реакция проходит по следующей схеме похожей на каталитический процесс пероксидазы с донорами [Yonetani, Ray, 1966; Ком, 1978; Pappa et al., 1996]:



E — цитохром с пероксидаза.

Методом быстро сканирующей спектрофотометрии показано, что при реакции образуются две промежуточные окисленные формы цитохром с пероксидазы, аналогичные промежуточным формам (E_1 и E_2) пероксидазы. Стехиометрия цитохром с пероксидазной реакции указывает на то, что восстановление обоих интермедиаторов — соединения I в соединение II и далее в стабильную восстановленную форму фермента — это одноэлектронный процесс, сходный с общепероксидазным [Ronnberg et al., 1981]. Однако исследование электронной структуры соединения

I цитохром с пероксидазы методами ЭПР и ЭЯДР [Hoffman et al., 1981; Wonnagura et al., 1996] показало, что железо гема в E_1 существует в оксиферрильной форме, а свободный радикал локализован на Met-171.

Из аминокислотной последовательности цитохром с пероксидазы известно [Takio et al., 1970; Wilcox et al., 1996], что Met-171 расположен через два аминокислотных остатка в полипептидной цепи от проксимального His-174. Рентгеноструктурные исследования показали, что атом серы Met-171 может осуществлять прямое взаимодействие с простетической группой порфирина, так как он находится на расстоянии 5,6 Å от железа гема [Poulus et al., 1980]. Из кристаллографической структуры цитохром с пероксидазы также известно, что окисленный Met-171 должен легко взаимодействовать с нуклеофильными остатками боковой цепи, такими как Gly-239, His-174, Tyr-153. Поэтому одним из предположений, объясняющим существование стабильного свободного радикала на аминокислотном остатке полипептидной цепи, является то, что атом серы метионина может взаимодействовать с кислородом Gly-237 боковой цепи с образованием таутометрической формы основания Шиффа, которое стабилизирует дальнейшее взаимодействие промежуточных соединений цитохром с пероксидазы с донорами электронов. Однако эти предположения основываются только на рентгенографических данных, тогда как при образовании окисленных форм фермента может происходить смещение атомов в области активного центра, которое может вызывать появление в ближайшем окружении гема других белковых групп, отличающихся от аминокислотных остатков, определенных рентгеноструктурным анализом.

Пероксидаза с алкил- и ацетилперекисями [Угарова и др., 1981; Schonbaun, Lo, 1972], а также другими сильными окислителями различной природы, например, HOCl , HOBr , HClO_2 , ClO_2 , KBrO_3 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{Ag}$, TrCl_6 может образовывать соединения, идентичные промежуточным соединениям E_1 и E_2 , которые образуются в реакции с перекисью водорода. В работе [Угарова и др., 1981] предложены три пути действия этих агентов на пероксидазу: 1) снятие электронов окислителем непосредственно с пероксидазы; 2) промежуточное образование перекиси водорода; 3) образование некоторой промежуточной алкилгидроперекиси из молекулы кислорода и радикала, возникающего при реакции между окислителем и белком. Примером, доказывающим возможность существования данных путей, может служить реакция хлорида

(ClO₂) с пероксидазой и хлоропероксидазой, для которой хлорид выступает одновременно в качестве окислителя и источника галогена. На образование E₁ идет два моля пероксидазы и один моль хлора. Реакция протекает в две стадии с образованием промежуточного соединения пероксидазы с хлором, которое затем превращается в соединение E₁, причем в промежуточном соединении ионы хлора не координируются непосредственно с атомом железа гема.

Различное назначение гембелков находит свое отражение в значениях окислительно-восстановительных потенциалов пар Fe²⁺/Fe³⁺ (табл. 1). Для большинства гемоглобинов и миоглобинов эти потенциалы варьируются в пределах от +0,04 до +0,18 В при pH 6,0 [Antonini, Brunori, 1971], а для пероксидазы хрена и цитохром с пероксидазы редокс-потенциал имеет низкое значение -0,25 В [Yamada et al., 1975] и -0,19 В [Conroy et al., 1978] соответственно. Так как все эти гембелки содержат в качестве проксимального лиганда имидазол, то разницу в их редокс-потенциалах можно объяснить за счет аддитивного влияния нескольких факторов, таких как различные длины связей и валентных углов между железом гема и проксимальным гистидином в этих белках, а также различиями во взаимодействиях между железом и дистальными лигандами полипептидной цепи.

ГЛАВА II

ПЕРОКСИДАЗА – КАТАЛИЗАТОР БИОГЕННЫХ СИСТЕМ

2.1. СТРОЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

Пероксидаза относится к группе двухкомпонентных ферментов, в составе которых гемин, представленный протопорфирином IX в комплексе с трехвалентным железом, и полипептидная цепь (рис. 1). Последняя включает от 203 до 308 аминокислот, и в зависимости от природы изофермента, формирует компактную третичную структуру, представленную двумя доменами (большим и малым). [Welinder et al., 1972]. Фермент имеет размер белковой глобулы равный 50 Å [Clementi, Palade, 1969], содержащий около 43% α -спиральных участков [Strickland, 1968]. Гемин нековалентно закреплен в углублении полипептидной цепи между доменами, и удерживается там за счет гидрофобных связей и солевого мостика, образованного между остатком пропионовой кислоты гемина с одной из аминокрупп апобелка [Угарова и др., 1981]. Гемин можно обратимо отделить от белка при кислых pH [Maehly, 1952]. Железо протопорфирина может находиться в высокоспиновом $d_{5/2}^5$ или низкоспиновом $d_{1/2}^5$ состояниях, образует четыре координационные связи с пиррольными ато-

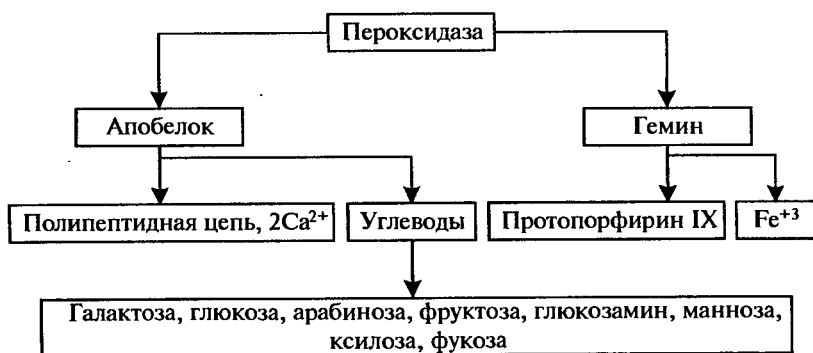


Рис. 1. Схема формирования нативной структуры пероксидазы

мами азота порфирина и одну координационную связь с функциональной группой апобелка [Угарова и др., 1981]. По данным ЯМР спектроскопии пятым аксиальным лигандом железа является имидазольная группа гистидинового остатка апобелка [Ishimaru, 1980; Teraoka, Katagauwa, 1981].

Располагаясь в гидрофобной полости апобелка, гемин ориентирован так, что его пропионовокислые остатки направлены к поверхности, а винильные группы протопорфирина обращены во внутреннюю часть белка [Савицкий и др., 1977; Угарова и др., 1981]. Планарная структура гемина предполагает его фиксацию внутри белка за счет π -электронных взаимодействий пиррольных колец протопорфирина с аминокислотными остатками, главным образом с остатком тирозина, фенилаланина, триптофана, гистидина и метионина. Используя замещенные гемины, с этерифицированными карбоксильными группами в 6 и 7 положениях, было показано, что реконструированные ферменты реагируют с перекисью водорода с образованием промежуточного соединения E_1 с теми же скоростями, как и нативная пероксидаза [Araiso et al., 1979; Araiso, Dunford, 1981]. Авторами было высказано предположение, что карбоксильные группы пропионовокислых остатков гемина не играют роли в образовании соединения E_1 пероксидазы. Однако в работе [DiNello, Dolphin, 1981] показано, что даже незначительные изменения структуры заместителей в 6 и 7 положениях резко уменьшает скорость связывания модифицированных геминнов с апопероксидазой и активность реконструированных ферментов. По-видимому, пропионовокислые остатки гемина участвуют в его связывании с белком и важны для правильной ориентации гема на белке и поддержании активной нативной структуры фермента.

Комплексообразование апопероксидазы с гемом резко повышает устойчивость фермента к действию УФ-облучения и температуры. Удаление гемина приводит к потере пероксидазной активности, но не сказывается на ее оксидазной функции [Siegel, Galston, 1967; Березин и др., 1975a].

Нативный фермент имеет в составе нейтральные и аминокислоты в количестве до 20% общего веса [Shannon et al., 1966]. Молекулы сахаров могут присоединяться только к пяти аминокислотным остаткам из тех двадцати, которые входят в состав полипептидной цепи [Sharon, 1974]. Углеводные цепи предохраняют фермент от инактивации радикалами, образующимися в ходе реакций, и уве-

личивают термическую стабильность пероксидазы. Удаление углеводов хотя и не влияет на каталитическую активность фермента, однако приводит к ускорению его инактивации в ходе реакции [Клячко, 1997].

В составе полипептидных цепей пероксидаз содержится от 6 до 8 SH-групп, которые связаны в 3-4 дисульфидные связи [Shin et al., 1971]. В состав молекулы пероксидазы включены два иона кальция, которые мало влияют на каталитическую активность, однако необходимы для поддержания высокой термической стабильности фермента [Haschke, Friedhoff, 1978; Ogawa et al., 1979].

Известно, что белки являются амфотерными полиэлектролитами, т.е. сочетают в себе кислотные и основные свойства. Кислотные свойства белку придают кислые аминокислоты (аспарагиновая, глутаминовая), а щелочные свойства — основные аминокислоты (лизин, аргинин, гистидин). Чем больше кислых аминокислот содержится в белке, тем ярче выражены его кислотные свойства, и чем больше входит в состав белков основных аминокислот, тем сильнее проявляются его основные свойства. Причем pI каждого белка определяется соотношением кислых и основных групп боковых радикалов аминокислот: чем выше соотношение кислые/основные аминокислоты в белке, тем ниже его изоэлектрическая точка [Строев, 1986]. Нами проведена оценка содержания заряженных аминокислот в различных изоферментах (A₁, B и C) пероксидазы (табл. 3). Видно, что в составе полипептидной цепи фермента содержится всего от 22 до 26% заряженных аминокислот. Таким образом, $\frac{3}{4}$ части полипептидной цепи пероксидазы представлены гидрофобными и незаряженными аминокислотами. Наличие высокой степени гидрофобности белковой молекулы позволяют предположить, что пероксидаза может являться мембранным ферментом, что и было доказано изучая каталитическую активность пероксидазы в системах обращенных мицелл, в том числе и АОТ [Клячко, 1990; Клячко и др., 1997]. В экспериментах использовались нативная и рекомбинантная пероксидазы. Последняя не содержала углеводных остатков на поверхности белковой молекулы. Показано, что стабильность фермента зависит от степени гидратации ПАВ ($w_o = [H_2O]/[AOT]$). В экспериментах использовались два подхода нековалентной модификации микросреды внутренней полости мицеллы. Во-первых, в водный буферный раствор, солюбилизированный обращенными

Таблица 3

Состав аминокислот, входящих в первичную структуру изоферментов пероксидазы, и их некоторые физико-химические свойства [Delincée, Radola, 1970; Phelps et al., 1971; Shih et al., 1971; Welinder, Mazza, 1977; Welinder, 1979]

Изоферменты пероксидазы	Всего аминокислот	Аминокислоты (%)					pI	Кислые/ основные
		неполяр- ные	полярные	заряженные				
				всего	положи- тельно	отрица- тельно		
HRP-A ₁	267 (100)	104 (39)	104 (39)	59 (22)	14 (5)	45 (17)	3,6—4,2	3,2
HRP-B	300 (100)	129 (43)	92 (31)	79 (26)	29 (9)	50 (17)	8,7	1,7
HRP-C	308 (100)	130 (42)	99 (32)	79 (25)	30 (10)	49 (16)	9,0	1,6

мицеллами, была внесена глюкоза. Оказалось, что добавление 10%-ной глюкозы не приводило к изменению стабильности реконструированной пероксидазы при степени гидратации 10. Отсутствие стабилизирующего эффекта было объяснено тем, что размеры внутренней полости мицеллы и белка при этой степени гидратации совпадают и, по-видимому, вода вместе с растворенными в ней низкомолекулярными компонентами оказывается вытесненной из внутренней полости в район первых CH_2 -групп углеводородных остатков ПАВ.

Для реализации второго подхода были использованы ПАВ твин и спан, содержащие в своем составе сорбитовое кольцо. Введение 1 мМ (1% относительно концентрации АОТ) спана 80 приводило к достижению стабильности, характерной для нативной пероксидазы хрена в тех же условиях [Клячко и др., 1997].

На основании полученных данных было высказано предположение, что повышение активности и стабилизирующий эффект нативной пероксидазы в растворах ПАВ [Левашов, 1987], по-видимому, обусловлены наличием на поверхности белковой глобулы фермента углеводных фрагментов, ковалентно связанных с белком, содержащих галактозу, глюкозу, арабинозу, фруктозу, глюкозамин, маннозу, ксилозу и фукозу [Klapper, Hackett, 1965; Андреева, 1988]. Эти углеводные фрагменты на поверхно-

сти белковой молекулы могут быть использованы при связывании пероксидазы с углеводами клеток. Так, показано сродство одной из пероксидаз — перонектина к фибронектину — одному из углеводсвязывающих белков — лектинов [Johansson, 1997]. При этом растительные пектинсвязывающие белки иммунохимически сходны с витронектином и некоторые из них являются пероксидазами. Кроме этого пероксидаза хрена способна связываться с поперечно сшитой агарозой [Lascu et al., 1986]. Выявлена высокая специфичность в связывании анионных пероксидаз корней пшеницы к хитину, полимеру N-ацетил-D-глюкозамина, входящего в состав клеточной стенки грибов, что может реализоваться в защитной роли этих изоформ пероксидазы в растениях при грибной инфекции [Максимов, 1994; Максимов и др., 1995].

Для полного понимания механизмов функционирования пероксидаз необходимо знание их пространственной структуры [Упоров, Егоров, 1997]. К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа (РСА) разрешены третичные структуры некоторых пероксидаз — цитохром С пероксидазы из дрожжей [Poulos et al., 1987], грибной пероксидазы [Kurishima et al., 1994], марганцевой пероксидазы [Sundaramoorthy et al., 1994], пероксидазы арахиса [Schuller et al., 1996]. Для изофермента С пероксидазы хрена также установлена пространственная третичная структура фермента методом РСА с разрешением около 2 Å [Gajhede et al., 1996], однако координаты атомов этого белка до сих пор закрыты для пользователей. Поэтому построение модели активного центра пероксидазы хрена основано на гомологии с первичной последовательностью пероксидазы арахиса, имеющей высокую степень сходства в строении третичной структуры и координаты которой открыты для доступа. Причем степень идентичности аминокислотных последовательностей этих ферментов превышает 50%. Используя такую высокую гомологичность, в работе [Упоров, Егоров, 1997] построили модель пространственной структуры пероксидазы хрена, которая предполагает в основном такой же фолдинг, как и пероксидаза арахиса: 10 α -спиралей A-J (рис. 2). В спирализованные участки белковой молекулы входят аминокислотные остатки с номерами полипептидной цепи: А спираль — 14-28, В спираль — 31-45, С спираль — 76-90 и D спираль — 92-112. Третичная структура фермента скрепляется четырьмя дисульфидными мостиками между аминокис-

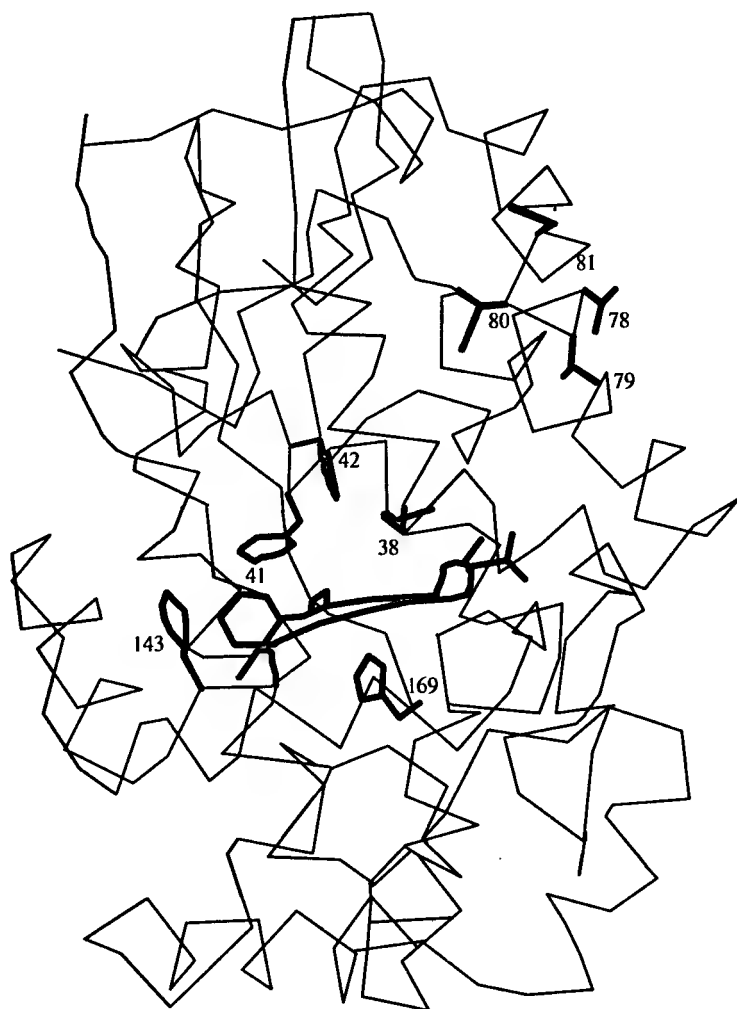


Рис. 2. Кристаллическая структура пероксидазы арахиса [Schuller et al., 1998]. Показаны дистальные остатки His-42, Arg-38, Phe-41, проксимальный His-169, координирующий гем в активном центре пероксидазы, Phe-142, Phe-143 на входе в активный центр.

лотными остатками: 11-91, 44-49, 97-301 и 177-209, которые расположены внутри молекулы. Центры гликозилирования пероксидазы хрена расположены на поверхности белка и доступны для формирования комплекса с углеводами, которые включают аминокислотные последовательности состава Asp-X-Ser/Thr с номе-

рами 13-15, 57-59, 158-160, 186-188, 198-200, 214-216, 255-257 и 268-270. Молекула пероксидазы содержит восемь олигосахаридных цепочек.

Высказано предположение, что два иона Ca^{2+} , участвующие в стабилизации трехмерной структуры молекулы пероксидазы хрена, координируют с аминокислотными остатками (43, 46, 48, 50, 64) и (171, 222, 225, 228, 230); в координации железа гемина (Phe-41, Phe-152, His-170, Leu-250) и в связывании ароматических субстратов (Ile-180, Phe-221, Ile-244). Активный центр фермента представлен Arg-38, Phe-41, His-42. В дистальной области гемового кармана находятся две молекулы воды [Gajhede et al., 1996].

Одним из новых подходов к изучению линейных антигенных детерминант является антигенное картирование белков методом пептидного сканирования (PEPSCAN). Суть этого метода заключается в синтезе коротких перекрывающихся олигопептидов — фрагментов аминокислотной последовательности изучаемого белка и их тестирование с помощью иммуноферментного анализа на взаимодействие с поликлональными антителами [Аммосова и др., 1997]. Непрерывные или линейные антигенные детерминанты представляют собой непрерывный участок полипептидной цепи, и конформационные антигенные детерминанты состоят из аминокислот, но сближенных в пространстве и не обязательно связанных пептидной связью [Максютов, Загребельный, 1993].

Используя этот метод были определены линейные антигенные детерминанты изофермента С пероксидазы хрена (рис. 3) [Аммосова и др., 1997]. Показано, что линейные антигенные детерминанты фермента, некоторые из которых пространственно локализованы в регулярных элементах вторичной структуры α -спиралях, расположены как с наружи, так и внутри белковой глобулы. Часть эпитопов локализована в петлях и изгибах пептидной цепи пероксидазы, обладает «нерегулярной» конформацией. В составе полученных антигенных детерминант наиболее часто встречались десять аминокислот — Arg, Ser, Ala, Thr, Leu, Ile, Val, Phe, Pro, Asn. В состав эпитопов входили заряженные аминокислоты Arg и Asp, неполярные аминокислоты Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Pro и Trp и незаряженные полярные аминокислоты — Asn, Thr, Ser, Gln, Tyr, Gly (составляющие 13,4, 51,2 и 35,4% соответственно от общего состава детерминант). Таким образом, на поверхности белковой глобулы фермента преиму-

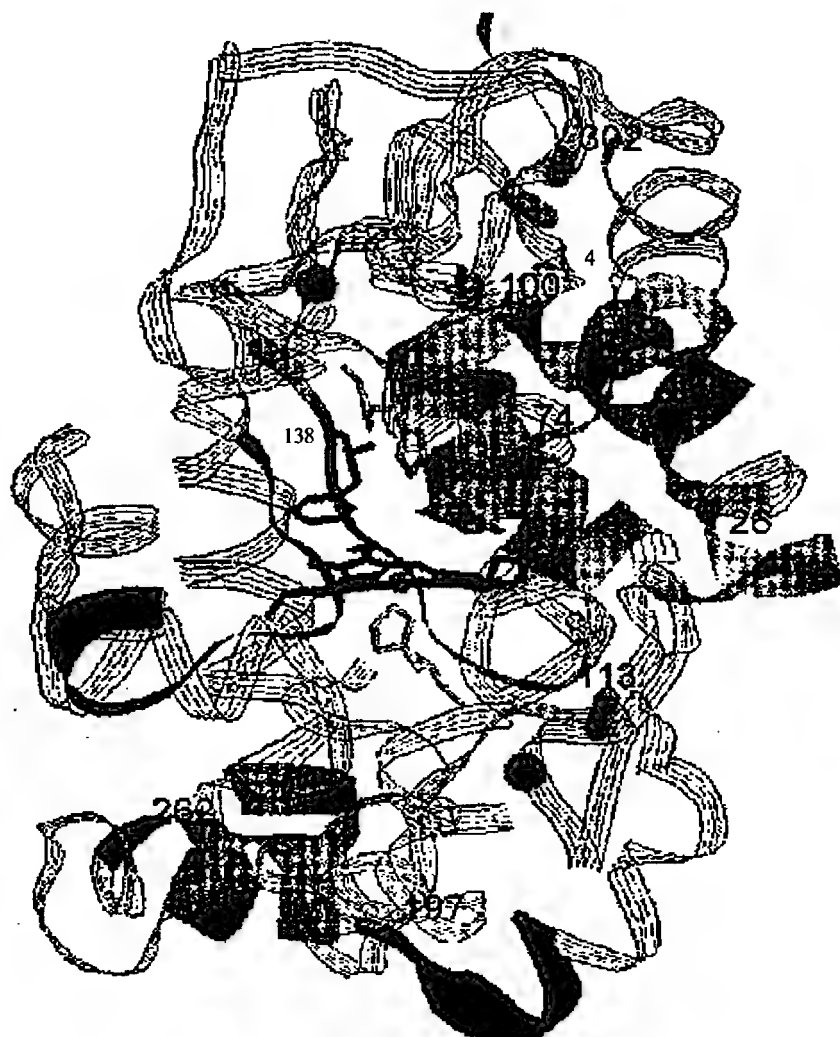


Рис. 3. Схематический вид эпитопов НRPC. Участки полипептидной цепи, входящие в эпитопы, представлены в виде затемненных сплошных лент. Также на рисунке изображены гем и аминокислотные остатки, входящие в активный центр; ионы кальция (в виде шариков) и дисульфидные связи (в виде цилиндров) [Аммосова и др., 1997].

щественно располагаются гидрофобные аминокислотные остатки. Три из восьми пептидов, гликозилированные в нативной молекуле пероксидазы хрена (13-15, 198-200, 268-270), входили в состав эпитопов, остальные же гликозилированные аминокис-

кислотные остатки были расположены достаточно далеко от антигенных областей. Выявленные эпитопы содержали несколько функционально важных остатков: Arg-38, входящий в активный центр пероксидазы хрена и Phe-142, Phe-143, формирующие канал доступа ароматических субстратов к активному центру фермента. Большая часть аминокислотных остатков, участвующих в связывании кальция, в координации железа гемина и в образовании субстратсвязывающего участка, не входили в состав антигенных детерминант, что согласуется с предположениями о том, что эти участки являются консервативными и стабильными структурами [Welinder, 1985], расположенными внутри белковой глобулы.

Используя методику ренатурации рекомбинантной пероксидазы хрена, были получены формы фермента с точечными мутациями F41H и H143E [Газарян и др., 1995]. При этом известно, что Phe-41 локализован между остатками дистальных His-40 и His-42. Последний координирует атом железа гемина в активном центре пероксидазы хрена. Тогда как, остаток Phe-143 расположен в проксимальной области гемина вблизи входа в гемсвязывающую полость и совместно с Phe-142, способен формировать субстратсвязывающий участок активного центра пероксидазы. Данные мутации приводили к падению удельной ферментативной активности более чем в 40 раз, с проявлением влияния на различные стадии каталитического механизма. Замена F41H вызывала понижение каталитической константы скорости по перекиси водорода на два порядка и на один порядок по АБТС. При окислении иодида мутация приводила к смене каталитического механизма. Тогда как замена H143E влияла преимущественно на стадию окисления АБТС и отщепление продукта его окисления. При этом в реакции окисления иодида данный мутант имел на порядок меньшие константы скорости как по перекиси водорода, так и по иодиду. На основании проведенных исследований высказаны предположения, что роль замещенных остатков фенилаланинов (Phe-41 и Phe-143) состоит в формировании гидрофобной полости, обеспечивающей прочное нековалентное связывание порфиринового цикла гемина (рис. 4, а) [Газарян и др., 1995].

Таким образом, активный центр пероксидазы представляет область на поверхности белковой глобулы, расположенной с дистальной стороны гемина, образованной из спиралей А, В, С, D (рис. 4, б). Активную роль в каталитическом процессе пероксидазного

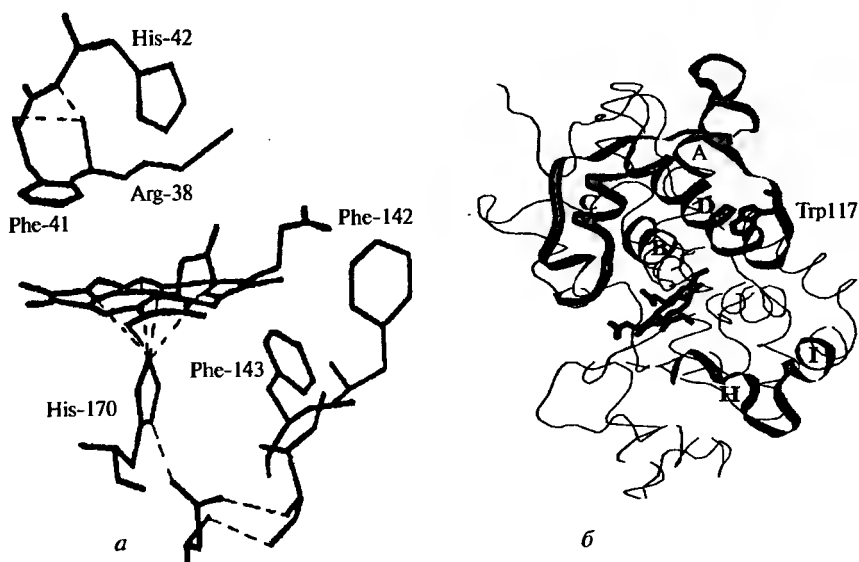


Рис. 4. Модель активного центра (а) [Veitch et al., 1992] и модельная структура пероксидазы хрена (б) (показаны участки, структурно-сходные с ауксин-связывающими белками (черным цветом), α -спирали А, В, С, D, H и I, гем и остаток Trp-117 [Савицкий и др., 1998]).

окисления субстратов принимает участие Fe^{3+} , координирующий с четырьмя атомами азотов пирролов протопорфирина, проксимальным лигандом которого является остаток имидазола гистидина белка (His-170). Шестым лигандом является молекула воды. В процессе восстановления перекиси водорода участвуют His-42 и Arg-38, расположенные в спирали В [Schuller et al., 1996; Gajhede et al., 1996; Аммосова и др., 1997; Газарян и др., 1998].

В координации гемина принимают участие остатки фенилаланинов (Phe-41 и Phe-143), роль которых заключается в формировании гидрофобного окружения нековалентно связанного гемина и обеспечение его прочного встраивания в белковую глобулу [Газарян и др., 1995].

Субстратсвязывающая площадка для соединений органической природы представлена протяженной гидрофобной областью, включающей Arg-38, Phe-142, Phe-143 (рис. 4, а). Местом связывания для оксидазных субстратов пероксидазы, в частности ИУК, может быть дистальный субдомен (рис. 4, б), включающий спирали А (целиком), В (середина), С (начало), D (целиком) и переход спирали D к D' [Упоров, Егоров, 1997; Савицкий и др., 1998].

2.2. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ

Пероксидаза способна катализировать реакции оксидазного, пероксидазного и оксигеназного окисления субстратов (рис. 5). Не обладая специфичностью в реакциях индивидуального пероксидазного окисления, фермент способен приобретать избирательность в реакциях совместного окисления субстратов. Хотя участие фермента в оксигеназных реакциях мало исследовано.

Наличие у фермента двух различных функций (оксидазной и пероксидазной) позволяет предположить, что в каталитическом действии фермента могут принимать участие два независимых активных центра пероксидазы, пространственно разделенных, хотя и близко расположенных друг от друга на молекуле фермента [Gibson, Lin, 1978]. Такая полифункциональность пероксидазы модулируется ионами металлов и состоянием микросреды вблизи молекулы [Bakardjieva, 1986; Pang et al., 1989]. При этом идентификация пероксидазного и оксидазного участков фермента затруднена из-за недостаточности количественных данных о деталях структуры пероксидазы и ее молекулярной неоднородности [Андреева, 1988].

Широкое распространение пероксидазы в растительных и животных тканях позволяет говорить, что этот фермент выполняет

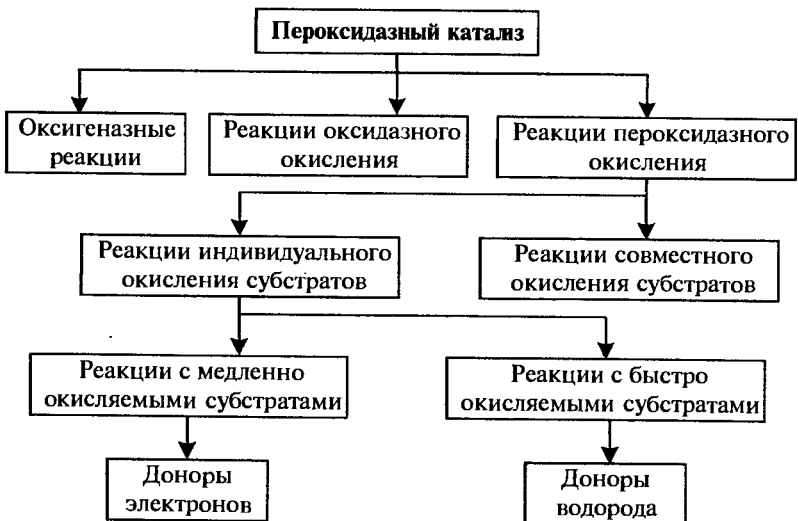


Рис. 5. Каталитические свойства пероксидазы.

многогранную работу в биогенных системах. Поэтому исследование структуры и механизма действия пероксидазы представляет не только теоретический интерес для понимания физиологической роли и принципов функционирования фермента, но и имеет важное практическое значение, поскольку пероксидаза широко используется в аналитических исследованиях [Угарова и др., 1981]. Поэтому мы рассмотрели механизм действия пероксидазы как в оксидазных, так и в пероксидазных реакциях окисления субстратов.

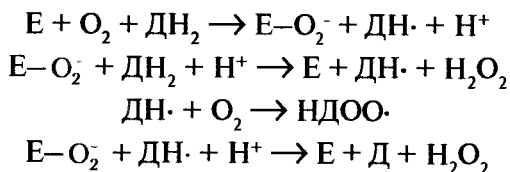
2.2.1. ПЕРОКСИДАЗА В РЕАКЦИЯХ ОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ

Приоритет в открытии оксидазной функции пероксидазы принадлежит Теореллю [Swedin, Theorell, 1940], который обнаружил в растениях фермент, окисляющий дигидроксифумаровую кислоту с поглощением кислорода и доказал, что этот фермент — пероксидаза. Оксидазными субстратами пероксидазы могут быть гидро-, нафтохиноны, индолилуксусная кислота, НАДН₂, НАДФН₂, флороглюцин, диоксифумаровая кислота, глутатион и др. [Иванова, Рубин, 1962, 1963; Piette, 1963; Klapper, Hackett, 1963, 1965; Рубин, 1966; Yamazaki, Kay et al., 1967; Рамазанова и др., 1971; Березин и др., 1975б; Srivastava, Huystee, 1977].

Особенностью механизма действия пероксидазы в оксидазных реакциях является способность фермента в процессе каталитической реакции генерировать свободные радикалы: O_2^- , HO_2 и радикал органического субстрата. Типичным субстратом в оксидазных реакциях пероксидазы является диоксифумаровая кислота [Saunders et al., 1964]. Оксидазное окисление ДФК исследовал Чанс, используя метод остановленной струи при pH 4 [Chance, 1952]. Было показано, что для проведения реакции при 4 °C требовалось присутствие ионов марганца, однако повышение температуры способствовало протеканию реакции и в отсутствие ионов марганца. Для пероксидазы, активированной ионами марганца, Чанс определил константу взаимодействия с кислородом ($10^6 M^{-1}сек^{-1}$), и показал, что образующийся комплекс $PO-O_2$ реагирует с ДФК, с константой равной $4 \cdot 10^5 M^{-1}сек^{-1}$.

В работе [Березин и др., 1975б] показано, что автокаталитический характер оксидазного окисления ДФК обусловлен образованием в ходе реакции H_2O_2 и других соединений типа гидроперекисей. Активной промежуточной формой пероксидазы, которая

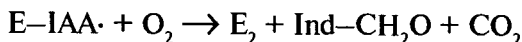
накапливается в достаточно большой концентрации, является соединением III. Предложена следующая схема реакций.



Кислород может участвовать не только в ферментативной реакции, но и в реакции с радикалами субстрата. Последняя приводит к образованию гидроперекисного радикала, который далее превращается в молекулу гидроперекиси при отрыве водорода от молекулы субстрата. Образующаяся в реакции перекись водорода и гидроперекиси являются субстратами пероксидазы. Реакция их с ферментом приводит к образованию соединения I, которое далее взаимодействует с субстратом ДФК, инициирует образование дополнительных количеств радикалов $DN\cdot$ в системе и способствует увеличению скорости окисления ДФК. При высоких концентрациях пероксидазы отмечается значительное возрастание скорости инициирования свободных радикалов. При этом увеличивается вероятность взаимодействия промежуточного соединения III со свободными радикалами. Эта реакция может быть причиной отклонения от линейной зависимости между скоростью реакции окисления ДФК и концентрацией пероксидазы, что отмечалось при высоких концентрациях фермента [Березин и др., 19756].

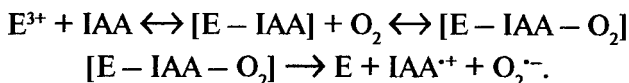
Рост и развитие растений стимулируется с помощью гормонов, среди которых наиболее важным является ИУК [Полевой, 1989; Гамбург и др., 1990]. Ауксин может подвергаться окислению кислородом, которое катализируется пероксидазой [Siegel, Galston, 1967; Sahulka, 1970; Saijo, Takeo, 1974; Srivastava, Huystee, 1977].

Механизм оксидазного окисления ИУК впервые предложили Рикард и Джоб [Ricard, Job, 1974], которые указали на специфичность реакции и предложили механизм превращения ИУК в индол-3-альдегид, происходящего непосредственно в активном центре пероксидазы. Ими было установлено, что радикал ИУК может удерживаться молекулой белка и реагировать с кислородом с образованием соединения II (E_2):



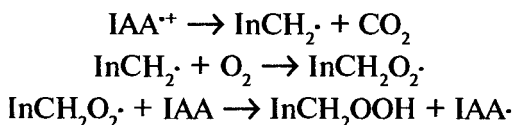
$Ind-CH_2O$ – гипотетический интермедиат, индол-3-эпоксид.

Подробное исследование этой реакции позволило установить, что пероксидазы растений являются высокоспецифичными оксигеназами ИУК и реакционный цикл начинается с образования тройного комплекса фермент-ИУК-кислород, приводящего к катион-радикалу ИУК [Gazaryan et al., 1996]:



$IAA^{\bullet+}$ — катион-радикал ИУК, а $O_2^{\bullet-}$ — супероксид анион-радикал.

В кислой среде катион-радикал ИУК декарбоксилируется и превращается в радикал скатола [Gazaryan et al., 1996]. Радикалы скатола реагируют с молекулярным кислородом, образуя перокси-радикалы [Gazaryan et al., 1998] и далее перекись скатола по реакции [Gazaryan, Lagrimini, 1998]:



$IAA\cdot$ — индолил-радикал, $InCH_2\cdot$, $InCH_2O_2\cdot$, $InCH_2OOH$ — радикал, перокси-радикал, перекись скатола соответственно.

Исследуя реакцию оксидазного окисления ИУК, катализируемое пероксидазой хрена, было высказано предположение, что фермент способен одновременно связывать как перекись скатола, так и молекулу ИУК. Таким образом, в активном центре пероксидазы существует участок специфического связывания ИУК, отличающийся от области активного центра, где способна связываться и расщепляться перекись водорода или органическая гидроперекись [Gazaryan et al., 1996; 1998]. При этом перокси-радикал превращается в активном центре фермента не повреждая его, тогда как перокси-радикалы, образующиеся при окислении фенолов в аэробных условиях, инактивируют фермент [Ma, Rokita, 1988].

Оксидазные реакции, катализируемые пероксидазой, могут ускоряться другими соединениями. Такой эффект был выявлен при изучении индивидуального и совместного оксидазного окисления ИУК [Coldacre et al., 1953; Гуськов и др., 1985]. При этом отмечено, что скорость оксидазного окисления ИУК пероксидазой

резко возрастало в присутствии 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Однако механизм реакции авторами не исследовался.

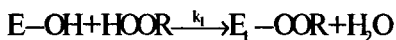
Таким образом, в реакциях оксидазного окисления, пероксидаза способна катализировать окисление органических соединений, среди которых могут быть и функционально активные вещества. Причем в каталитическом процессе участвует белковый компонент. Реакция сопровождается образованием продуктов свободнорадикального окисления которые приводят к образованию активных форм кислорода. При этом образующаяся перекись водорода взаимодействует с ферментом с образованием соединения I, которое инициирует пероксидазные реакции. По-видимому, в этом случае могут параллельно протекать как реакции оксидазного, так и пероксидазного окисления. Причем последние ускоряют окисление органических субстратов. Образование радикалов органических соединений может способствовать модификации функциональных групп белка, участвующих в катализе, что может приводить к инактивированию фермента, проявляемое в понижении скорости ферментативной реакции. Наличие данного процесса продемонстрировано в реакции оксидазного окисления диоксифумаровой кислоты [Березин и др., 19756]. Используя в качестве субстрата пероксидазы *o*-дианизидин, который окисляется только перекисью водорода и не окисляется кислородом. Показано, что в системе ДФК-ПО-О₂ наблюдается окисление *o*-дианизидина, причем скорость его окисления возрастала с увеличением концентрации ДФК. Поэтому образование перекиси водорода в ходе оксидазных реакций пероксидазы является пусковым механизмом для последующего протекания пероксидазных реакций фермента. Данный механизм может быть использован организмами, находящимися в состоянии покоя или гибернации, поскольку активизация оксидазных процессов в биогенной системе может служить пусковым механизмом для покоящихся систем, обеспечивая их энергетические потребности при выходе из состояния покоя.

2.2.2. ПЕРОКСИДАЗА В РЕАКЦИЯХ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ

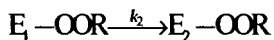
2.2.2.1. Пероксидаза в реакциях индивидуального окисления субстратов

Реакция пероксидазы с перекисью водорода приводит к образованию нескольких промежуточных соединений, которые имеют характерные максимумы поглощения (табл. 2). Впервые эти

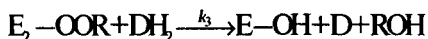
соединения изучил Чанс [Chance, 1943; 1949b; 1952], предложивший следующую схему взаимодействия пероксидазы с перекисью водорода:



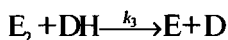
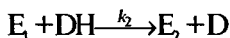
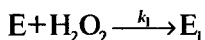
Образовавшееся соединение E_1 неустойчиво и переходит в соединение E_2 :



При наличии большого избытка перекиси соединение E_2 переходит в соединение E_3 . Однако в присутствии донора водорода соединение E_2 восстанавливается до нативного фермента:



Изучая реакции пероксидазы с различными донорами, Чанс показал, что доноры электронов реагируют в 50–100 раз быстрее с соединением E_1 , чем с E_2 [Chance, 1952], поэтому им была предложена следующая схема:



E , E_1 , E_2 — нативная и промежуточные полуокисленные формы фермента, DH — субстрат.

В настоящее время эта схема принята большинством исследователей, занимающихся изучением реакций пероксидазного окисления субстратов. Промежуточными соединениями пероксидазы в этих реакциях являются продукты окисления фермента перекисью водорода, а не комплекса фермента с субстратом [Jones, Dunford, 1978]. Образование соединения E_1 происходит через ряд промежуточных стадий с формированием одного или более предшественников [Dunford, Hewison, 1977; Jones, Dunford, 1977].

Соединение E_1 является промежуточной формой пероксидазы с константой перехода в E_2 5 с^{-1} [Chance, 1949b]. Константа скорости образования E_1 не зависит от pH в диапазоне от 3,5 до 11, а изменение температуры от 40 до 80 °C не влияет на про-

филь рН-зависимости [Jones, Dunford, 1977]. Нитрат ингибирует образование соединения E_1 , связываясь внутри гемового «кармана», что проявляется в увеличении кажущейся рК дистальной каталитической группы [Araiso, Dunford, 1980]. Константа скорости начальной стадии взаимодействия пероксидазы с перекисью водорода является диффузионной [Dunford, Hewison, 1977], влияние на нее оказывает только природа перекиси. Важность гидрофобных взаимодействий для образования E_1 показана на примере связывания пероксибензойных кислот с пероксидазой [Job, Jones, 1978], у которых сродство к ферменту возрастало с увеличением протяженности гидрофобного заместителя. Тогда как при взаимодействии пероксидазы с гидроперекисями большое значение приобретает электростатический фактор, так как ионизация перекисей приводила к полной остановке реакции [Davies et al., 1976]. Соединения E_1 и E_2 представляют собой промежуточные окисленные формы пероксидазы. Переходы $E_1 \rightarrow E_2$ и $E_2 \rightarrow E$, являются одноэлектронными процессами. При этом E_1 обладает двумя окисленными эквивалентами по сравнению с нативной формой фермента, а E_2 — одним. Методами спектроскопии ЯМР показано, что как в E_1 , так в E_2 железо присутствует в феррильной форме, т.е. имеет формальный заряд +4 [Maeda, Marita, 1967; Moss et al., 1969; Stillman et al., 1976]. Дополнительный окислительный эквивалент в молекуле E_1 локализуется либо на порфириновом макроцикле, либо на одной из функциональных групп апобелка [Morishima, Ogawa, 1978; La Mar et al., 1981; Loew et al., 1977; Kaneko et al., 1980].

По реакционной способности окисляющиеся субстраты Данфорд предложил разделить на три группы [Dunford, Stillman, 1976]: 1) легко окисляемые — фенолы и амины с электродонорными заместителями в бензольном кольце; 2) средне окисляемые — ферроцианид-, сульфит- и нитрит-ионы, а также фенолы и амины с электронно-акцепторными заместителями в бензольном кольце; 3) трудно окисляемые — иодид-ионы.

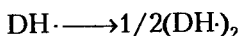
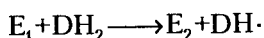
Механизмы реакций соединений E_1 и E_2 пероксидазы с различными субстратами различаются в зависимости от природы субстрата (табл. 4). Классифицируя субстраты по характеру взаимодействия с ферментом, соединения подразделяют на взаимодействующие и не взаимодействующие с гемом. Выделяя субстраты для которых возможен непосредственный контакт с

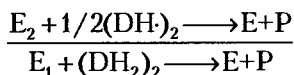
Таблица 4

Величины каталитических констант реакций окисленных форм пероксидазы (E_1 и E_2) с различными фенолами [Critchlow, Dunford, 1972; Job, Dunford, 1976].

Фенолы с заместителями	$k_2 \cdot 10^{-4}, M^{-1}s^{-1}$	$k_3 \cdot 10^{-3}, M^{-1}s^{-1}$
<i>n</i> -NH ₂	23000	—
<i>n</i> -OCH ₃	13000	—
<i>o</i> -OCH ₃	900	300
<i>n</i> -CH ₃	4200	1000
<i>m</i> -CH ₃	7900	—
<i>m</i> -OH	800	—
H	280	—
<i>m</i> -OCH ₃	240	—
<i>m</i> -OC ₂ H ₅	127	—

гемом (ферроцианид-, сульфит-, нитрит-, тиоцианат-ионы), и такие, для которых по данным спектроскопии ЯМР подобный контакт невозможен (ароматические фенолы и амины, другие органические соединения). Первая группа субстратов является донорами электронов, а вторая — донорами атома водорода [Лебедева, Угарова, 1996]. При этом пероксидазное окисление органических соединений может быть реализовано с использованием различных механизмов [Угарова и др., 1981]. Так, например, нетривиальный механизм выявлен в реакциях пероксидазного окисления *p*-крезола. Показано, что из рН-зависимости $\lg k_2$ определяется функциональная группа в активном центре фермента с $pK \sim 5,0$, протонирование которой ингибирует реакцию, тогда как для других субстратов пероксидазы протонирование группы с $pK \sim 5,0$ проявлялось в увеличении k_2 . Изучение реакции позволило прийти к заключению, что *p*-крезол образует с соединением E_1 комплекс Михаэлиса [Hewson, Dunford, 1976a], и ионизированная форма *p*-крезола не реагирует с соединениями E_1 и E_2 [Critchlow, Dunford, 1972]. Установлено, что в данной реакции *p*-крезол взаимодействует с соединением E_1 пероксидазы в соотношении (2:1). В соответствии с чем был предложен механизм двухэлектронного окисления *p*-крезола [Hewson, Dunford, 1976b], согласно которому вместе с электроном переносится и протон:

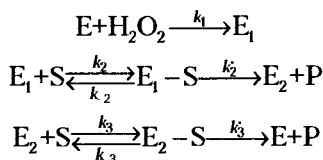




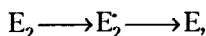
E — пероксидаза, DH_2 — *p*-крезол, P — продукт реакции.

Эта схема предложена Данфордом на основе аналогичной реакции гваякола с промежуточными соединениями пероксидазы, которая имела стехиометрию (2:1) [Santimone, 1975]. Аналогичная схема использовалась и для объяснения механизма пероксидазного окисления *L*-тирозина, где тоже наблюдается стехиометрия субстрата к E_1 , равная 2:1 [Ralston, Dunford, 1978].

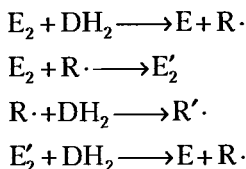
Для реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия авторы предлагают схему, в соответствии с которой предполагаются стадии комплексообразования окисленного субстрата с промежуточными соединениями пероксидазы E_1 и E_2 (Лебедева, 1980).



Используя дейтерированную воду показано, что в реакции пероксидазного окисления ферроцианида с соединениями E_1 и E_2 транспорт протона не является скоростью—лимитирующей стадией [Dunford et al., 1978]. Тогда как в реакции окисления *p*-аминобензойной кислоты (ПАБК) лимитирующая стадия включает перенос протона [Hubbard et al., 1975]. Для объяснения сложного механизма окисления ПАБК была предложена следующая схема:



которую можно представить в виде последовательных реакций генерирования свободных радикалов.



$R\cdot$ — начальный свободный радикал окисленной ПАБК; $R'\cdot$ продукт реакции ПАБК с $R\cdot$.

$R\cdot$ и $R'\cdot$ могут дальше реагировать с субстратами или другими донорами обычным свободнорадикальным путем. Механизмы реакций соединений E_1 и E_2 пероксидазы с различными субстратами различаются в зависимости от природы субстрата. Так, восстановительный процесс с ферроцианидом калия происходит по одноэлектронному механизму [Лебедева и др., 1981], субстраты I^- и HNO_3 осуществляют прямое восстановление соединения E_1 до нативной пероксидазы [Itagaki, Palmer et al., 1967]. Величины K_m не зависят от pH для реакции пероксидазного окисления ферроцианида и обнаруживают сильную зависимость от pH при $pH > 7,0$ в реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина [Лебедева, Угарова и др., 1977]. При $pH > 6,0$ k_2 не зависит от pH для реакций пероксидазного окисления ферроцианида [Hasinoff, Dunford, 1970], *p*-аминобензойной кислоты [Hasinoff, Dunford, 1970] и *p*-крезола [Ralston, Dunford, 1978] и уменьшается в случае нитрит-ионов [Roman, Dunford, 1973].

Изучение образования свободных радикалов в каталитической реакции пероксидазы при низкой температуре показало, что свободные радикалы в системе появляются только после перехода E_1 в E_2 [Douzov, Leterrier, 1970]. С помощью ЭПР обнаружены промежуточные свободные радикалы в пероксидазных и оксидазных реакциях пероксидазы с фенолами, нафтолами и бензолами, а также в пероксидазных реакциях метгемоглобина.

В настоящее время установлен молекулярный механизм расщепления перекиси водорода в активном центре пероксидазы [Gajhede et al., 1996]. В механизме восстановления перекиси участвуют железо (III) протопорфирина IX и два ключевых дистальных аминокислотных остатка — His-42, Arg-38. В начале молекула перекиси водорода связывается в шестом координационном положении с железом гема. Протон от перекиси переходит на гистидин, который выполняет роль основания. При этом аргинин обеспечивает перераспределение электронной плотности между атомами кислорода, способствуя гетеролитическому расщеплению связи в молекуле перекиси водорода. Конечным этапом каталитического процесса является стадия, в которой происходит возврат гистидином протона гидроксилу, связанному с аргинином, и молекула воды покидает активный центр фермента. Перераспределение электронов приводит к образованию оксиферрильной формы гема с

π-катион-радикалом на порфириновом кольце, которое называется соединением I пероксидазы.

Проникновение перекиси водорода происходит в дистальную область через канал, размеры которого определяют специфичность доступа субстратов в активный центр пероксидазы. В формировании канала доступа принимают участие последовательность аминокислот первичной структуры фермента с номерами 138-143, которая определяет субстратную специфичность пероксидаз [Gazaryan, Egorov, 1996].

Исследование механизмов индивидуального окисления субстратов, катализируемое пероксидазой, способствовало созданию представления о пероксидазе как ферменте, не обладающем избирательностью действия и способного окислять широкий спектр субстратов неорганической и органической природы, в присутствии перекиси водорода. Однако это мнение может быть опровергнуто при проведении реакций совместного окисления субстратов, в которых проявляется специфичность действия фермента и упорядоченность процесса пероксидазного окисления. Очередность реакций окисления при этом задается более высоким сродством одного из субстратов.

2.2.2.2. Пероксидаза в реакциях совместного окисления субстратов

При пероксидазном окислении двух субстратов отмечается активация окисления одного субстрата и ингибирование другого [Лебедева, Угарова, 1996]. При этом активации подвергается окисление медленно окисляемого субстрата и частичное или полное ингибирование превращения быстро окисляемого субстрата. Реакции совместного окисления субстратов имеют биологическое значение, так как по сравнению с реакциями индивидуального окисления более предпочтительны в живых организмах. Исследование этих реакций позволит разобраться в возможностях механизма действия пероксидазы и с учетом этих реакций выявить особенности функционирования пероксидазы в растительных и животных тканях, а также расширить аналитическое применение фермента.

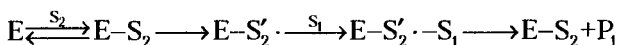
Совместное пероксидазное окисление субстратов, катализируемое пероксидазой хрена, можно представить в виде нескольких различающихся между собой механизмов.

Во-первых, ускорение окислительной реакции может быть достигнуто за счет того, что оба субстрата способны одновременно связываться с апобелком или сродство медленно окисляемого

субстрата выше к каталитическому участку активного центра фермента. При этом один из субстратов при связывании в области активного центра может изменять полярность среды, обеспечивая лучшее связывания окисляемого субстрата или участвовать в процессе переноса электронов и т.д.



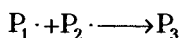
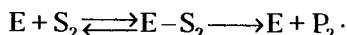
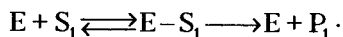
Другим механизмом может быть активация окисления медленно окисляемого субстрата (S_1) фермент-субстратным комплексом, образованного в виде молекулы белка с полуокисленной формой быстро окисляемого (S_2) субстрата по следующей схеме:



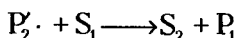
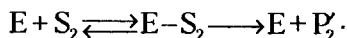
Такой механизм предложен для реакции совместного окисления *o*-дианизидина и ферроцианида калия. Органический субстрат, связавшийся на поверхности белковой глобулы окисляется, и в результате образуется фермент-субстратный комплекс с полуокисленным субстратом, эффективно окисляющий ферроцианид или любой другой медленно окисляемый субстрат [Лебедева и др., 1981].

Таким образом, для системы ферроцианид калия — *o*-дианизидин — пероксидаза предложен механизм субстрат-субстратной активации, предполагающий непосредственное участие белковой глобулы фермента в каталитическом процессе. В пользу последнего также свидетельствовал тот факт, что *o*-дианизидин не ускорял окисление ферроцианида в отсутствие пероксидазы, хотя неферментативная реакция также протекала с участием промежуточных радикальных форм [Лебедева, Угарова, 1996]. При этом, образующийся на поверхности белковой глобулы полуокисленный продукт может быть активно использован в биогенных системах как механизм повышающий возможности биогенных систем при их адаптации к экстремальным условиям.

Совместное окисление близких по реакционной способности субстратов может приводить к образованию продуктов смешанной структуры, при этом происходит последовательное окисление обоих субстратов с образованием полуокисленных свободно-радикальных продуктов, реакция между которыми и является завершающей стадией каталитического процесса, описать который можно следующей схемой:



При совместном окислении быстро (S_2) и медленно (S_1) окисляемых субстратов, активация последних достигается за счет того, что при окислении быстро окисляемого субстрата образуются полуокисленные продукты ($P_2 \cdot$), взаимодействие с которыми и приводит к окислению медленно окисляемого субстрата.



На основании проведенного анализа реакций совместного окисления субстратов можно сказать, что широкая субстратная специфичность пероксидазы обеспечивается разнообразными механизмами ее окислительных реакций, которые осуществляются, главным образом, за счет высокой реакционной способности промежуточных форм фермента, образующихся только при наличии стабильного гем-белкового комплекса.

2.3. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

Активно работающим ферментом растительных и животных тканей является пероксидаза. Фермент способен выполнять самые разнообразные функции в живых организмах, что обуславливается разнообразием механизмов его действия, способностью катализировать реакции оксидазного и пероксидазного окисления субстратов, которые были рассмотрены ранее (рис. 6).

Местом локализации фермента в растительных клетках могут быть гранулы и вакуоли [Czaninski, Catesson, 1969; Birecka, Galston, 1970; Grob, Matile, 1980; Schloss et al., 1987], а также шероховатый эндоплазматический ретикулум, пузырьки и цистерны аппарата Гольджи [Ferrer et al., 1991; Ros Barcelo et al., 1991]. Синтез пероксидазы происходит на полисомах [Stephan, van Huystee, 1981], а местом гликозилирования является аппарат Гольджи [Gripshover et al., 1984]. Биосинтез фермента регулируется поступ-



Рис. 6. Функциональная роль пероксидазы в растительных и животных тканях.

лением перекиси водорода, которая образуется в реакциях катализируемых НАДФН-оксидазой [Doke, Ohashi, 1988], диамино- и полиаминооксидазами [Angelini, Federico, 1989; Slocum, Furey, 1991], супероксиддисмутазой [Apostol et al., 1989], а также и самой пероксидазой в присутствии ионов марганца в реакциях окисления НАДФН₂ [Muder et al., 1980; Ishida et al., 1987].

Пероксидаза растительных клеток способна перемещаться по эндоплазматическому ретикулуму и аппарату Гольджи, а затем проникать в пространство между клеточной мембраной и клеточной стенкой [Zimmerlin et al., 1994]. Этот процесс активно протекает при образовании лигнифицированной клеточной стенки и оболочки семян растений с образованием дитирозиновых связей [Fry, 1987]. Таким образом, фермент может участвовать в формировании ковалентных поперечных связей в клеточных стенках в процессе развития растений и при заражении их патогенами [Zimmerlin et al., 1994].

Обнаружено увеличение активности пероксидазы в участках листовой пластинки овсяницы, где элонгация клеток замедляется и останавливается. Высказывается предположение, что это может свидетельствовать об участии фермента в терминации клеточного роста путем сшивания полисахаридов клеточной стенки через образование диферуловой кислоты. После окончания кле-

точного роста начинается лигнификация, последнюю стадию которой катализирует пероксидаза. Причем в лигнификации и образовании диферуловой кислоты принимают участие разные изоформы пероксидазы, обнаруженные в листовой пластинке овсяницы, однако в зоне элонгации преобладали два катионных изофермента [MacAdam, 1993].

Основная функция растительных пероксидаз прежде всего защитная [Роговина и др., 1996]. В ответ на различные вирусные, грибковые и бактериальные инфекции растения начинают генерировать ферменты, способные уничтожить проникший фитопатоген. В состав активной компоненты системы входят пероксидаза, НАДФ-Н₂-оксидаза и супероксиддисмутаза [Cottle, Kolattukudy, 1982; Doke, 1985; Southerton, Deverall, 1990; Apostol et al., 1989; Хайруллин и др., 2000а; 2000б].

При инфицировании растений фитопатогенными микроорганизмами активизируется биосинтез анионных форм пероксидаз [Graham, Graham, 1991; Melon, 1991]. При этом запускаются механизмы синтеза вокруг инфекционных структур гриба, устойчивого к ферментативному расщеплению полимера лигнина, создающего барьер на пути проникновения патогена в растительную клетку. Другим препятствием для распространения инфекции может быть суберин, в синтезе которого так же участвуют анионные пероксидазы [Melon, 1991; Espellie et al., 1986]. Одновременно с лигнификацией клеточной стенки растений происходит образование токсичных для грибных клеток растительных фенольных метаболитов [Куч, 1985; Шервуд, Вэнс, 1985]. Пероксидазные системы растений окисляя фенолы, превращают их в более токсичные для фитопатогенов хиноны [Kosuge, 1969]. Сами хиноны подвергаются или двухэлектронному восстановлению до гидрохинона или одноэлектронному восстановлению до семихинонового радикала, которые и проявляют цитотоксическое действие [Роговина и др., 1996].

В повышении устойчивости растений к неспецифическим факторам воздействия принимает участие система антиоксидантной защиты в составе низко- и высокомолекулярных антиоксидантов (СОД, каталаза и пероксидаза). Широкий спектр изопероксидаз (кислые и щелочные формы), позволяет ферменту активно реагировать на стрессовые воздействия (Gaspar et al., 1985). Причем выявлен двухступенчатый механизм контроля щелочными и кислыми пероксидазами при ответе растений на различные физико-

химические и биологические воздействия. При этом любой стресс индуцирует деполяризацию клеточной мембраны, в результате изменяется соотношение $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$, а это ведет к выделению из клетки растворимых веществ среди которых могут быть доноры электронов, такие как аскорбиновая кислота и соединения фенольной природы.

Увеличение внутриклеточного кальция может приводить к активированию секреции основных пероксидаз в свободное пространство, где они, взаимодействуя с донорами электронов и, возможно, с циркулирующей ИУК, утилизируют перекиси; ослабление связи основных пероксидаз с мембранными структурами позволяет им действовать как 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК)-оксидаза [Acosta et al., 1991]. Реакция протекает только в присутствии Mn^{2+} и H_2O_2 или активированной формы пероксидазы (E_1). Высокая концентрация перекиси водорода резко снижала потребление кислорода. Образование этилена зависело от содержания кислорода и было опосредовано свободными радикалами АЦК. Таким образом, ИУК и АЦК-оксидаза вызывают изменения в преобразовании этилена, который далее индуцирует увеличение синтеза фенилаланин-аммиак-лиазы и кислых пероксидаз. Эти два механизма, контролируемые разными пероксидазами, могут быть главными в тех реакциях, которые активизируются в ответ на различные воздействия.

Различные типы воздействий генерируют различные виды свободных радикалов, например перекисные радикалы, которые участвуют в перекисном окислении липидов. Маркером этого процесса является этан, участвующий в перераспределении электрохимического потенциала электронов на мембране. Разрушение липопротеидов клеточных мембран при перекисном окислении липидов изменяет статус ионов и их вытекание на уровне плазмалеммы, что позволяет выходить из клеток и таким соединениям, как фенолы и аскорбиновая кислота. При этом жирные кислоты могут способствовать активированию пероксидазы и ее конформационным изменениям. Используя свободные пероксидные радикалы, основные пероксидазы разрушают доноры электронов и действуют как агенты детоксикации перекисей в реакциях метаболизма, выполняя защитную функцию (Андреева, 1988).

В ряде работ приводятся данные (Roberts, 1983; Wieringa-Brants, Dekker, 1987), что фактор, индуцирующий защитные про-

цессы, может передаваться потомству. Причем приобретенная устойчивость передается через семена.

Сам факт передачи устойчивости через семена является весьма обнадеживающим и дает возможность поиска путей расшифровки сущности механизма приобретенной устойчивости (Андреева, 1988).

Одним из компонентов механизмов покоя является антиоксидантная система, поддерживающая жизнеспособность организма при проявлении его пониженной функциональной активности. При этом компоненты АОС могут не только обеспечивать продолжительность состояния покоя, но и при создании благоприятных условий активировать выход из состояния гипобриоза живых организмов [Рогожин, Курилюк, 1996]. Ведущим звеном этой системы являются процессы перекисного окисления липидов, запускающие у покоящихся организмов основные процессы жизнедеятельности. Доказательствами этого утверждения служат следующие факты. При создании благоприятных условий (температура, влажность, кислород) семена могут прорастать [Николаева и др., 1985; Обручева, Антипова, 1997]. Однако предварительно у них должно активироваться дыхание. В покоящихся семенах дыхание крайне ослаблено, отмечаются изменения в составе жирных кислот и функционально активных веществ мембран митохондриальной системы за счет которых обеспечивается разобщение механизмов окислительного фосфорилирования при сохранении активности окислительных процессов [Скулачев, 1996]. Однако при активизации дыхания поступивший кислород ускоряет пусковые механизмы процессов ПОЛ. Контроль за этими процессами осуществляет антиоксидантная система в составе низкомолекулярных (аскорбиновая кислота, гидрохинон, мочева кислота, мочеина, глутатион и др.) и высокомолекулярных (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза) соединений [Кения и др., 1993; Меньщикова, Зенков, 1993; Зенков, Меньщикова, 1993]. Причем между компонентами системы просматривается взаимная зависимость [Верхотуров, 1999]. Среди ферментов следует выделить пероксидазу, которая, обладая широкой субстратной специфичностью, способна катализировать реакции окисления различных органических соединений [Угарова и др., 1981]. Причем особенностью механизма действия пероксидазы является способность фермента катализировать окисление органических субстратов с участием

кислорода, т.е. фермент может осуществлять роль оксидазы. Оксидазными субстратами фермента, как было сказано выше, служат индолил-3-уксусная кислота, диоксифумаровая кислота и др. Продуктами окисления в оксидазных реакциях являются супероксид анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$) и катион-радикал ИУК, последний в кислой среде декарбоксилируется, превращаясь в радикал скатола. Радикалы скатола могут реагировать в дальнейшем с молекулярным кислородом, образуя перокси-радикалы и далее перекись скатола (Савицкий и др., 1998). Поэтому генерация свободных радикалов пероксидазой в оксидазных реакциях фермента может быть условием для его участия в процессах свободнорадикального окисления в семенах пшеницы, а фермент может осуществлять роль инициатора образования свободных радикалов в семенах [Рогожин, 1999; Рогожин и др., 2000a].

В круг пероксидазных субстратов фермента входят различные функционально активные вещества в том числе и антиоксиданты [Рогожин, Верхотуров, 1998б]. В реакциях индивидуального окисления эти соединения чаще всего являются медленно окисляемыми субстратами, однако при совместном окислении с быстро окисляемым субстратом, скорость их пероксидазного окисления может возрастать в 100 и более раз [Лебедева, Угарова, 1996; Рогожин, Верхотуров, 1998в]. Пероксидаза способна осуществлять контроль за уровнем перекиси, восстанавливая ее до воды и при этом окислять низкомолекулярные антиоксиданты. В процессе каталитической реакции могут образовываться свободные радикалы, которые в начальный момент прорастания семян способны инициировать реакции свободнорадикального окисления, активируя при этом протекание перекисного окисления липидов [Рогожин, 1999]. Следует выделить ряд особенностей в проявлении активности пероксидазы в покоящихся и прорастающих семенах. Так, например, в сухих семенах выявляется высокая пероксидазная активность, коррелирующая с уровнем их жизнеспособности. Тогда как низкая активность фермента свидетельствует о понижении жизнеспособности и всхожести семян [Рогожин, Егорова, 1991].

В условиях искусственного гипобиоза, вызванного длительным затоплением семян в воде, у них так же отмечается увеличение содержания антиоксидантов, сопровождающееся уменьшением уровня ПОЛ. Тогда как использование низких концентраций перекиси водорода при набухании семян, в последних повышается перек-

сидазная активность, коррелирующая с возрастанием их всхожести [Нариманов, Корыстов, 1998; Рогожин, 2001].

Набухание и прорастание семян сопровождается активированием ПОЛ, изменением в составе антиоксидантов и повышением активности пероксидазы в десятки и более раз [Рогожин, Егорова, 1991]. У непроросших семян отмечается повышение содержания антиоксидантов при пониженном уровне ПОЛ и пероксидазной активности. В прорастающих семенах происходит переключение дегидрогеназных реакций на аэробные, которые могут осуществляться с помощью эндогенных функционально активных веществ. При этом активность дегидрогеназ может регулироваться различными концентрациями АТФ, а пероксидазы — ИУК.

Субстратами пероксидазы могут быть и фитогормоны (абсцизовая кислота, гибберелловая кислота, ауксины и др.), поэтому фермент имеет большое значение в регуляции состава функционально активных веществ в тканях растений и животных. Причем окисление БАВ ферментом способствует генерации свободных радикалов в семенах, а как следствие этого процесса является активизация ПОЛ. Вслед за этими процессами в семенах возрастает дыхание, повышается общий уровень метаболических процессов, что проявляется в ускоренном прорастании семян, активно выходящих из состояния покоя [Рогожин, 1999].

2.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ В АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В этой главе мы кратко рассмотрим использование пероксидазы в аналитических исследованиях поскольку этой теме посвящено очень много обзоров [Долманова, Угарова, 1980; Угарова и др., 1981; Угарова, 1982; McCapra, Behesti, 1985].

Использование пероксидазы в аналитических исследованиях можно представить в виде общей схемы (рис. 7).

Пероксидаза хрена и специфические антитела против нее (АнтиПХ) широко используются в иммуноферментном анализе [Иммуноферментный ..., 1988; Ким, 1989] и иммуноцитохимии [Поллак, Ван Норден, 1987]. Способов использования пероксидазных реакций в аналитических целях в настоящее время накопилось очень много. Однако особый интерес вызывают способы анализа



Рис. 7. Способы и методы использования пероксидазы в аналитических исследованиях.

веществ, используемых в реакциях совместного окисления. Так, например, амидопирин относится к классу пиразолонов, которые широко применяются в медицине в качестве жаропонижающих средств и анальгетиков [Машковский, 2002]. Соединения этой группы используются и в диагностических целях, заменяя канцерогенные бензидин, *o*-толуидин, *o*-дианизидин [Канцерогенные ..., 1987; Searle, 1984]. Поэтому совместное пероксидазное окисление 4-аминоантипирина с фенолом или его производными, дающее интенсивно окрашенные продукты, используется при ферментативном определении глюкозы и в иммунохимических тестах [Вербов, 1986]. Тогда как сам амидопирин применяется для диагностики скрытых кровотечений [Плетнева, 1987], особенности пероксидазного окисления которого изучены в работе [Качурин и др., 1991].

Реакции совместного окисления субстратов используются для определения активности пероксидазы [Саксонов и др., 1993]. Так, например, предложено определять активность пероксидазы, используя смеси в составе пирокатехин и резорцин или гваякол и бензидин. Причем эти методы в несколько раз были более чувствительны, чем методы определения пероксидазной активности при использовании этих соединений в реакциях индивидуального окисления.

Разработан способ в основе которого используется совместное окисление гваякола и *p*-аминодиэтиланилина. При концентрации каждого из компонентов в 0,25–0,75 мМ метод позволял повысить чувствительность определения пероксидазной активности в 5–6 раз. Этот способ предлагается использовать для

определения пероксидазной активности в различных биологических образцах и в иммуноферментном анализе [Гончар, Сибирский, 1988]. Таким образом, активное использование пероксидазы в аналитических исследованиях обуславливает интерес к изучению механизма действия фермента в реакциях индивидуального и совместного окисления субстратов. Использование последних в аналитических исследованиях может способствовать разработке высокочувствительных методов анализа.

ГЛАВА III

ПЕРОКСИДАЗА В РЕАКЦИЯХ ОКИСЛЕНИЯ МЕДЛЕННО И БЫСТРО ОКИСЛЯЕМЫХ СУБСТРАТОВ

Пероксидаза катализирует окисление неорганических и органических соединений в присутствии перекиси водорода. По скорости окисления их можно условно разделить на быстро окисляемые (*o*-дианизидин, гидрохинон, *p*-крезол и т.д.) и медленно окисляемые (аскорбиновая кислота, NADH, люминол, ферроцианид и т.д.). Предложено [Угарова и др., 1981; Кутузова, 1981], что взаимодействие субстратов-восстановителей с промежуточными окисленными формами фермента может осуществляться при участии боковых функциональных групп белка. Методом химической модификации в пероксидазе обнаружена функционально важная имидазольная группа гистидина [Welinder, 1979; Welinder et al, 1972]. Многие другие остатки гистидина, триптофана, тирозина и т.д. маскированы внутри белковой глобулы [Савицкий, 1979; Кутузова, Угарова, 1981]. Однако участие пероксидазы в реакциях индивидуального и совместного окисления субстратов и особенности протекания этих реакций были недостаточно изучены. Не было представлено убедительных доказательств, объясняющих отсутствие специфичности в действии фермента при протекании индивидуальных реакций окисления и проявление специфичности пероксидазы в реакциях совместного окисления. Все эти и другие вопросы побудили нас провести детальное исследование поведения пероксидазы в реакциях индивидуального и совместного окисления, используя различные комбинации субстратов в реакционной среде. В качестве медленно окисляемых субстратов пероксидазы были выбраны ферроцианид и аскорбиновая кислота, а быстро окисляемыми — гидрохинон и *o*-дианизидин.

3.1. КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Механизмы действия пероксидазы в реакциях индивидуального окисления были изучены на примере окисления аскорбиновой кислоты, которая в растительных и животных клетках уча-

ствуется в окислительно-восстановительных реакциях, выполняет роль антиоксиданта и выступает в качестве гидроксилирующего агента при образовании кортикостероидов в надпочечниках [Гудвин, Мерсер, 1986; Кения, Лукаш и др., 1993; Buettner, Moseley, 1992; Mapson, 1967].

Аскорбиновая кислота может накапливаться в различных растительных клетках и тканях, а также в хлоропластах [Foyer et al., 1983], в митохондриях [Чупахина и др., 1987], в околоядерной зоне и внешнем слое цитоплазмы растительной клетки [Jensem, Kavaljian, 1956]. В клетках корня хрена вся АК сосредоточена в больших центральных вакуолях [Grob, Matile, 1980].

Методом остановленной струи измерены константы скорости реакции (k_2 и k_3) взаимодействия E_1 и E_2 с аскорбиновой кислотой [Smith, Williams, 1970]. Показано, что k_2 имеет значение $2,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, а k_3 — $2,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Следовательно, для пероксидазного окисления АК величины k_3 примерно в 100 раз меньше, чем k_2 . Причем величины констант k_2 и k_3 соизмеримы с величинами аналогичных констант, определенных для реакций пероксидазного окисления ферроцианида калия [Hasinoff, Dunford, 1970] и люминола [Prichard, Cormier, 1968; Пучкаев, Метелица, 1993].

Кинетические закономерности пероксидазного окисления АК в стационарных условиях практически не исследованы. Предложен калориметрический метод определения пероксидазного окисления АК. Обнаружено изменение стехиометрии реакции между АК и пероксидом водорода в зависимости от условий протекания пероксидазного процесса. Показано, что АК в пероксидажном процессе окисляется пероксидом водорода в стехиометрическом соотношении 1:1 при pH 5,0 и 1:2 при pH 7,4. Отмечено, что при pH 7,4 кинетика утилизации H_2O_2 при пероксидажном окислении АК имеет аномальный по сравнению с другими субстратами характер, что связано, по-видимому, с модификацией фермента в процессе реакции [Титов и др., 1992]. Однако более подробного исследования кинетических особенностей реакции не проводилось. Поэтому нами изучена кинетика реакций пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты, катализируемое пероксидазой хрена [Рогожин, Верхотуров, 1997].

Показано, что при окислении аскорбиновой кислоты, в действии пероксидазы реализуется сложный регуляторный механизм.

Таблица 5

Величины каталитических констант пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты

pH	K_{m1} , мкМ	K_{m2} , мкМ	k_{cat} , сек ⁻¹	k'_{cat} , сек ⁻¹	β	n
4,0		420 ± 34		24,7 ± 2,1		8
4,5		380 ± 28		20,2 ± 2,0		
5,0	9,7 ± 0,4	340 ± 31	2,1 ± 0,12	17,6 ± 1,5	18,6 ± 1,4	8
5,5	10,8 ± 0,5	170 ± 12	1,9 ± 0,11	6,8 ± 0,3	4,5 ± 0,3	7
6,0	6,1 ± 0,3	190 ± 10	1,1 ± 0,11	8,4 ± 0,9	12,4 ± 0,9	6
6,5		150 ± 13		4,0 ± 0,2		
7,0	11,5 ± 0,4	230 ± 18	1,1 ± 0,10	3,7 ± 0,1	7,5 ± 0,5	9
8,0		97 ± 7		3,8 ± 0,1		9

Установлено, что по величине k_{cat} равной 1,1–2,1 с⁻¹, АК можно отнести к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы (табл. 5). При этом константа связывания АК с окисленными формами пероксидазы соизмерима с K_m быстро окисляемых органических субстратов фермента (K_{m1} составляет 9,7–11,5 мкМ, а K_{m2} — 97–420 мкМ), поэтому предварительное связывание АК с

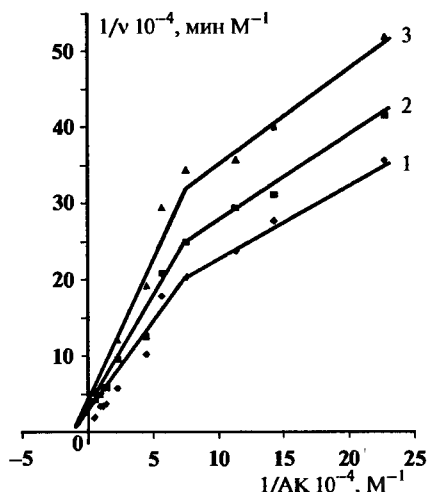


Рис. 8. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты от ее концентрации в координатах Лайнуивера-Берка. pH 5,0 — 1, 5,5 — 2, 6,0 — 3; пероксидаза — 0,1 мкМ; перекись водорода — 0,64 мМ; аскорбиновая кислота — 2,2–220,0 мкМ.

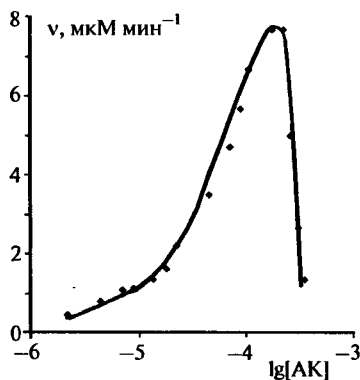


Рис. 9. Ингибирование реакции пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты ее избытком. pH 5,5; 0,1 М Na-ацетатный буфер; пероксидаза — 0,1 мкМ; перекись водорода — 0,64 мМ; аскорбиновая кислота — 22,0–352,0 мкМ.

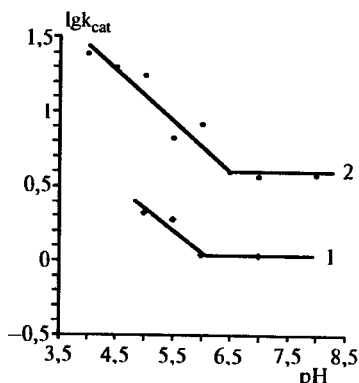


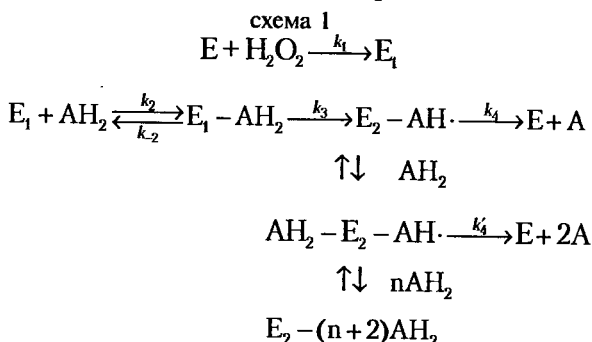
Рис. 10. Зависимость $\lg k_{\text{cat}}$ (1) и $\lg k'_{\text{cat}}$ (2) пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты от pH.

нескольких участков, реализующих механизм последовательного связывания молекул субстрата [Рогожин, 1996].

Аналогичное предположение образования тройного промежуточного комплекса E_2 с двумя молекулами донора водорода было высказано для объяснения кинетических закономерностей пероксидазного окисления люминола и пирогаллола в стационарных условиях [Dure, Cormier, 1963; 1964].

В каталитическом процессе пероксидазного окисления одной и более молекул АК принимают участие ионогенные группы фермента с $pK \sim 6,0$ и $6,5$ (рис. 10). Протонирование этих функциональных групп активного центра пероксидазы ускоряет каталитический процесс.

Для объяснения активации пероксидазного окисления АК и ингибирования фермента высокими концентрациями субстрата предложена схема 1 ферментативной реакции:



E_1 и E_2 может препятствовать их пероксидазному окислению. При связывании двух молекул АК процесс пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты ускорялся (рис. 8), а избыток АК способствовал понижению каталитической активности фермента (рис. 9). Активирование пероксидазы, по-видимому, обусловлено связыванием в активном центре фермента двух и более молекул субстрата, что позволяет предположить наличие протяженной субстратсвязывающей области на поверхности белковой глобулы, состоящей из не-

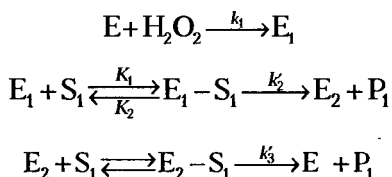
E , E_1 , E_2 — исходный фермент и его промежуточные соединения 1 и 2, соответственно, $АН_2$ — аскорбиновая кислота, $E_1 - АН_2$, $E_2 - АН\cdot$, $АН\cdot - E_2 - АН_2$, $E_2 - (n + 2)АН_2$ — комплексы одной, двух и $(n + 2)$ молекул аскорбиновой кислоты с промежуточными соединениями E_1 и E_2 , k_1 , k_2 , k_3 и k_4 — каталитические константы.

Схема 1 предполагает, что пероксидазное окисление АК осуществляется, если с окисленными формами фермента (E_1 и E_2) связываются одна или две молекулы АК. При этом связывание молекулы субстрата в одном из участков активного центра пероксидазы инициирует каталитический процесс, тогда как занятость сразу двух участков субстратами проявляется в активировании фермента. Однако ингибирующее действие субстрата реализуется при связывании нескольких (6–7) молекул АК в области активного центра или в месте расположения регуляторного участка.

3.2. КИНЕТИКА СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ ДВУХ МЕДЛЕННО ОКИСЛЯЕМЫХ СУБСТРАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ (АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА И ФЕРРОЦИАНИД КАЛИЯ)

Кинетика пероксидазного окисления ферроцианида калия была изучена ранее [Лебедева и др., 1981]. Показано, что при рН 5–7 K_m составляет 0,2–0,4 мМ, в то время как величина k_{cat} уменьшается с увеличением рН от 300 до 60 сек⁻¹. Предложена схема 2 пероксидазного окисления ферроцианида в стационарных условиях [Угарова и др., 1981].

схема 2

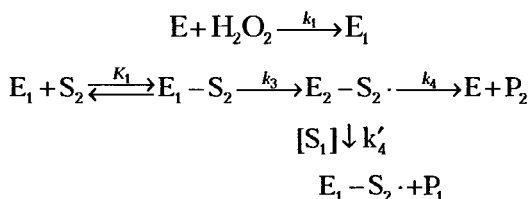


E , E_1 , E_2 — нативный фермент и его окисленные формы; S_1 — ферроцианид, $E_1 - S_1$, $E_2 - S_1$ — комплексы окисленных форм фермента с ферроцианидом.

Однако характер взаимодействия ферроцианида с ферментом пока недостаточно ясен. Невыясненным является и вопрос об об-

ласти активного центра пероксидазы для неорганических субстратов [Лебедева, Угарова, 1996]. Изучена стационарная кинетика совместного окисления ферроцианида калия и *o*-дианизидина [Ugarova et al, 1981]. Показано, что при совместном присутствии в реакционной среде ферроцианид и *o*-дианизидин окисляются при наличии перекиси водорода и пероксидазы дифференцированно. Окисление *o*-дианизидина не наблюдается до полного превращения ферроцианида. *o*-Дианизидин связывается в пероксидазе только с ее белковой частью. Образовавшийся радикал может не выходить в раствор, а оставаться на ферменте, образуя фермент-субстратный комплекс, который ускоряет окисление ферроцианида в 10–20 раз. Предложена схема 3 совместного окисления ферроцианида и *o*-дианизидина [Лебедева, Угарова, 1996].

схема 3



$E_1 - S_2$ — комплекс *o*-дианизидина (S_2) с E_1 , $E_2 - S_2$ — комплекс E_2 с полукисленным *o*-дианизидином, P_1 и P_2 — продукты индивидуального окисления ферроцианида и *o*-дианизидина соответственно.

В литературе имеется множество примеров субстрат-субстратной активации, т.е. ускорения окисления медленно окисляемого субстрата быстро окисляемым [Угарова и др., 1981]. При одновременном присутствии в растворе различных субстратов пероксидазы наблюдаются эффекты взаимной активации и ингибирования. При этом ингибирование либо имеет конкурентный характер, либо связано с дифференцированным окислением субстратов в присутствии пероксидазы [Лебедева, Угарова, 1996]. Однако практически отсутствуют сведения по стационарной кинетике совместного окисления двух медленно окисляемых субстратов, к которым относятся ферроцианид калия и аскорбиновая кислота. К тому же в ряде работ приводятся противоречивые данные о механизме катализируемого пероксидазой окисления ферроцианида калия [Савицкий, 1979; Угарова и др., 1981; Лебе-

дева, Угарова, 1996]. Его относят к группе субстратов, для которых возможен непосредственный контакт с гемом фермента [Савицкий, 1979]. Хотя известно, что при значениях pH близких к нейтральным гемин в пероксидазе недоступен даже малым ионам из раствора [Угарова и др., 1981]. Высказываются предположения, что широкую субстратную специфичность пероксидазы можно объяснить в рамках представления о ферменте как белке-проводнике, имеющем несколько различных каналов электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью его белковой глобулы, на железо гема. Некоторые из этих каналов транспорта электронов могут включать и порфириновый макроцикл [Лебедева, Угарова, 1996].

Имея разные участки связывания, молекулы АК могут осуществлять регулирование каталитического процесса. Однако оставался не решенным вопрос о взаимном регулировании каталитического процесса при окислении двух медленно окисляемых субстратов. Поэтому изучение совместного пероксидазного окисления ферроцианида и аскорбиновой кислоты позволило определить участки связывания этих двух медленно окисляемых субстратов на поверхности белковой глобулы фермента и объяснить механизмы их окисления [Рогожин, Верхотуров, 19996].

Показано, что при совместном окислении ферроцианида и аскорбиновой кислоты наблюдалось ускорение пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты (рис. 11), проявляемое в смешанном типе активации, при котором предварительное связывание ферроцианида облегчало последующее связывание АК, ускоряя ее окисление (рис. 12). Однако конкуренция между субстратами проявлялась еще и в том, что аскорбиновая кислота понижала скорость пероксидазного окисления ферроцианида, ингибируя фермент по смешанному типу, оказывая влияние как на связывание, так и превращение ФК (табл. 6). Характер ингибирования позволяет предположить, что участки связывания АК и ФК в активном центре пероксидазы пространственно удалены. При этом предварительное связывание одной молекулы АК в активном центре фермента затрудняло последующее связывание молекул ферроцианида. Однако связывание с ферментом двух молекул АК полностью блокировало реакции окисления ферроцианида.

Для объяснения кинетики совместного окисления ферроцианида калия и аскорбиновой кислоты предложена схема 4.

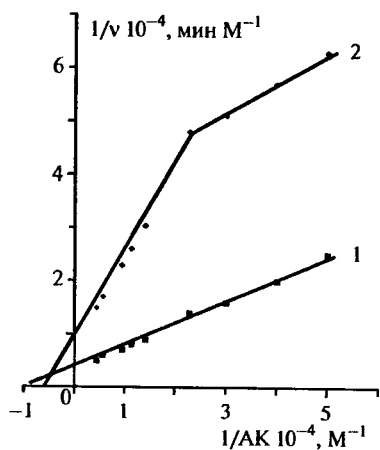


Рис. 11. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления АК от ее концентрации в координатах Лайнуивера-Берка в присутствии (1) и в отсутствие (2) ферроцианида калия. Концентрации: пероксидазы — 0,2 мкМ, H_2O_2 — 0,64 мМ, АК — 20–240 мкМ, ФР — 88 мкМ, pH — 7,0. Регистрация при 265 нм.

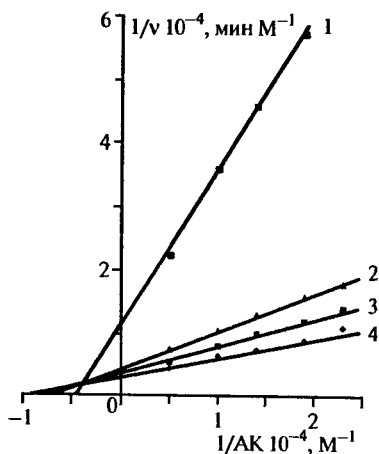


Рис. 12. Зависимости обратных начальных скоростей пероксидазного окисления АК от ее концентрации в координатах Лайнуивера-Берка при концентрациях ферроцианида калия: 1—0, 2—20, 3—40, 4—60 мкМ; концентрации: пероксидазы — 0,1 мкМ, H_2O_2 — 0,64 мМ, АК — 44–176 мМ, pH 5,0.

схема 4

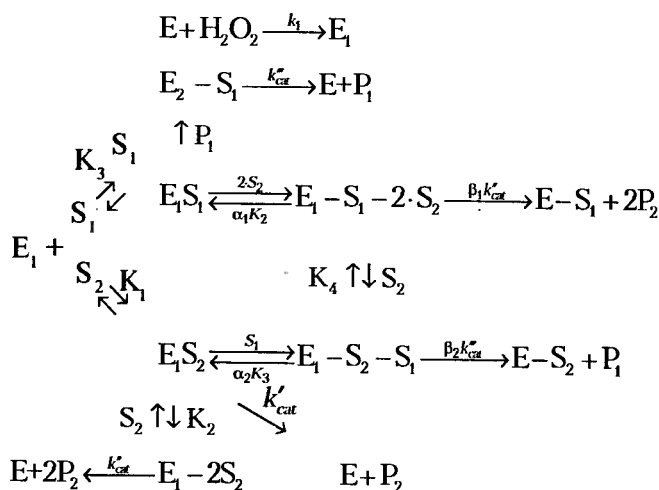


Таблица 6

Величины каталитических констант совместного пероксидазного окисления ферроцианида калия и аскорбиновой кислоты

pH	K_1 мкМ	K_2 мкМ	K_3 мкМ	k'_{cat} сек ⁻¹	k''_{cat} сек ⁻¹	k'''_{cat} сек ⁻¹	α_1	β_1	α_2	β_2
5,0	9,7	—	—	17,6	—	260	0,23	3,9	—	—
5,5	10,8	370	0,003	6,8	38	220	0,11	3,3	3,8	2,4
6,0	6,1	200	0,009	8,4	24	150	0,18	1,6	5,5	2,3
7,0	11,5	330	0,016	3,7	17	40	0,21	4,7	4,4	2,7

E , E_1 , E_2 — нативная и окисленные формы фермента; S_1 — ферроцианид; S_2 — аскорбиновая кислота; $E_1 - S_1$, $E_1 - S_2$, $E_2 - S_1$, $E_1 - 2S_2$ — комплексы окисленных форм пероксидазы с субстратами, $E_1 - S_2 - S_1$, $E_1 - S_1 - 2S_2$ — комплексы окисленных форм фермента с ферроцианидом и одной или двумя молекулами аскорбиновой кислоты; K_1 , K_2 , K_3 , K_4 — константы диссоциации соответствующих комплексов окисленных форм ферментов с субстратами (ферроцианидом и аскорбиновой кислотой); k_1 , k'_{cat} , k''_{cat} , k'''_{cat} — каталитические константы.

Учитывая взаимное влияние в процессе пероксидазного окисления ферроцианида и аскорбиновой кислоты, можно предположить, что выявленные эффекты обусловлены близким расположением участков связывания обоих субстратов в активном центре пероксидазы, что сказывается на их пероксидазном окислении. Преимущественное окисление донора водорода, возможно, обусловлено конформационными перестройками в соединениях E_1 и E_2 , предварительное связывание с которыми ферроцианида улучшает последующее связывание и превращение двух молекул аскорбиновой кислоты. Наблюдаемый эффект субстрат-субстратной активации и ингибирования в реакциях, катализируемых пероксидазой, обусловлен взаимной конкуренцией субстратов. При этом ингибирование имеет конкурентный характер, обеспечивая последовательное окисление субстратов в присутствии пероксидазы. Поэтому при совместном окислении аскорбиновой кислоты и ферроцианида калия наблюдается ингибирование пероксидазного окисления ферроцианида аскорбиновой кислотой, в то время как сам ферроцианид калия активирует ее окисление.

3.3. КИНЕТИКА СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ МЕДЛЕННО И БЫСТРО ОКИСЛЯЕМЫХ СУБСТРАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ (АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА И ГИДРОХИНОН)

Аскорбиновая кислота и гидрохинон в растительных и животных клетках могут участвовать в окислительно-восстановительных реакциях [Гудвин, Мерсер, 1986], выполнять роль антиоксидантов [Кения и др., 1993; Buettner, Moseley, 1992]. Известно, что гидрохинон, как и другие фенолы, участвует в различных метаболических процессах растений, однако его функции и свойства до конца не изучены. Попеременно окисляясь и восстанавливаясь, фенольные соединения служат связующим звеном между водородом дыхательного субстрата и кислородом окружающей среды [Андреева, 1988]. Используя изотопную метку было показано, что основным местом образования фенольных соединений являются молодые ткани растений [Запрометов, 1985]; особенно высокая скорость синтеза фенолов наблюдается при освещении в хлоропластах. В этих органеллах в процессе фотосинтеза с высокой скоростью образуются полифенолы сравнительно простой структуры, которые затем транспортируются в другие компартменты клетки [Андреева, 1988]. Биологическое действие фенольных соединений в клетке обусловлено наличием гидроксильных групп, которые способны к ступенчатой отдаче электронов [Барабай, 1984]. В инфицированных растениях активированный кислород может быть посредником в противомикробном действии растительных фенолов, которые способны ингибировать протекание цепных реакций метаболизма, запускаемых свободными радикалами [Аверьянов, Исмаилов, 1986].

Известно, что общим свойством пероксидазных систем являются эффекты активации, т.е. ускорение окисления медленно окисляемого субстрата быстро окисляемым. Поэтому нами был изучен тип взаимного регулирования активности пероксидазы, который реализуется в реакциях совместного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов. В качестве медленно окисляемого субстрата была выбрана аскорбиновая кислота, а быстро окисляемого — гидрохинон, для которого величины k_{cat} были равны 1220–2230 с⁻¹ (табл. 7) [Рогожин, Верхотуров, 1999г].

При проведении реакций совместного пероксидазного окисления с участием аскорбиновой кислоты и гидрохинона наблюдалось последовательное окисление субстратов с преимуществен-

Таблица 7

Величины каталитических констант совместного пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона

pH	$k_{cat}(T)^{\circ}$, с ⁻¹	$K_m(T)^{\circ}$, мкМ	K_a , мкМ	k_3 , с ⁻¹	k_4 , с ⁻¹	β_1	β_2	n'
4,0	1220±60	340±20	3,7±0,1	—	25,0±2,2	—	3,1±0,1	5
5,0	2210±210	360±25	6,7±0,2	2,1±0,12	18,0±2,5	3,2±0,2	9,2±0,5	7
5,5	2225±210	340±18	7,8±0,2	1,9±0,11	6,8±0,3	7,1±0,4	23,3±1,2	8
6,0	1910±150	300±15	10,7±0,3	1,1±0,11	8,0±0,9	11,5±0,5	34,8±2,5	2
7,0	1740±110	150±10	3,5±0,1	1,1±0,10	3,7±0,1	15,1±0,6	40,7±3,0	2
8,0	1520±100	80±5	0,19±0,02	—	2,9±0,1	—	3,7±0,2	8

ным окислением аскорбиновой кислоты. Гидрохинон ускорял реакции пероксидазного окисления АК, однако при этом сохранялась способность высоких концентраций окисляемого субстрата ингибировать пероксидазу. Особенность совместного окисления субстратов проявлялась в том, что активатор не влиял на K_m , повышая k_{cat} пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты (рис. 13). Это соответствует неконкурентному типу активации ($\alpha = 1$, $\beta > 1$) при котором субстрат и активатор связываются независимо в активном центре, образуя комплекс в котором ускоряется превращение субстрата [Березин, Клесов, 1976]. Ниже приведена схема 5, которая иллюстрирует суммарный процесс ферментативного окисления.

Таким образом, при совместном окислении АК и гидрохинона осуществлялся упорядоченный процесс окисления субстратов, в котором

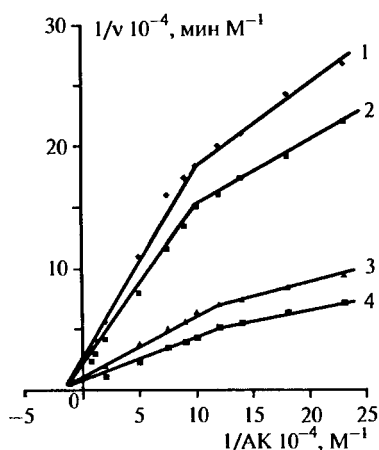
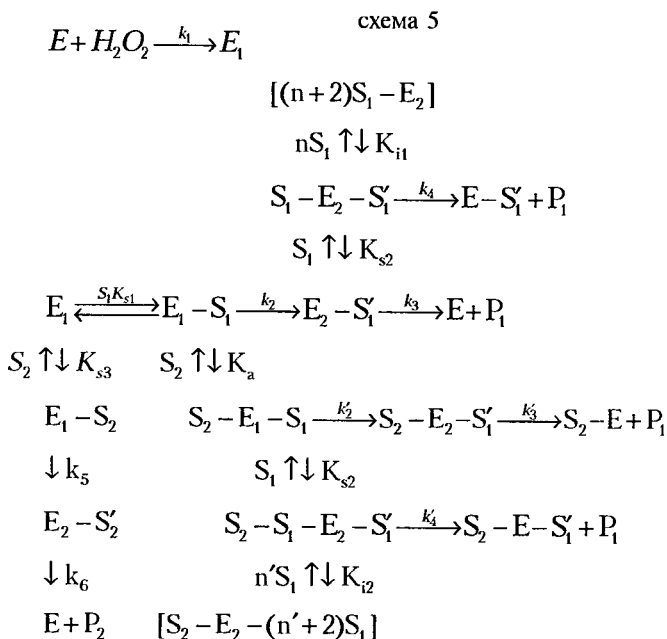


Рис. 13. Зависимости Лайнуивера-Берка для пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты при pH 5,5 в присутствии гидрохинона. Концентрации: пероксидаза — 94 нМ, перекись водорода — 0,64 мМ, АК — 2,2–176 мкМ, гидрохинон — 0 (1), 2 (2), 8 (3), 12 мкМ (4).

проявлялось преимущественное окисление медленно окисляемого субстрата. Очередность задавалась тем, что связывание АК с окисленными формами пероксидазы почти на два порядка лучше, чем гидрохинона. Предварительное связывание АК в активном центре фермента улучшало в 28—420 раз последующее связывание молекул гидрохинона. Однако связавшись гидрохинон не оказывает влияние на связывание второй молекулы АК, что выражалось в неконку-



E , E_1 и E_2 — исходный фермент и его промежуточные соединения 1 и 2 соответственно, S_1 , S_2 , P_1 , P_2 — аскорбиновая кислота, гидрохинон и продукты их окисления соответственно, $S_2 - E$, $E - S'_1$, $E_1 - S_1$, $E_1 - S_2$, $E_2 - S'_1$, $E_2 - S'_2$, $S_1 - E_2 - S'_1$, $S_2 - E - S'_1$, $S_2 - E_1 - S_1$, $S_2 - E_2 - S'_1$, $S_2 - S_1 - E_2 - S'_1$, $[(n' + 2)S_1 - E_2]$, $[S_2 - E_2 - (n + 2)S_1]$ — комплексы одной, двух, трех, $(n + 2)$ и $(n' + 2)$ молекул субстратов и их полуокисленных форм с нативным ферментом и промежуточными соединениями (E_1 и E_2). K_{s1} , K_{s2} , K_{s3} , K_a — константы диссоциации соответствующих комплексов фермента с субстратами, K_{i1} , K_{i2} — константы равновесия, k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k'_2 , k'_3 , k'_4 — каталитические константы ($k'_3 = \beta_1 k_3$, $k'_4 = \beta_2 k_4$).

рентном типе активирования. Присутствие гидрохинона в активном центре фермента способствовало ускорению окисления молекул АК в 4–41 раз. Особенно этот эффект проявлялся при pH 5,5–7,0. Оптимум активирования приходился на pH 6–7. Высокие концентрации АК ингибировали фермент как в реакциях индивидуального, так и совместного с гидрохиноном пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты. Причем, если в реакциях индивидуального окисления АК фермент при pH 6,0–7,0 ингибировали 6–9 молекул субстрата (табл. 5), то в реакциях совместного окисления АК и гидрохинона ингибирование пероксидазы было возможно двумя молекулами аскорбиновой кислоты (табл. 7). Поэтому активирование пероксидазы в реакциях индивидуального и совместного пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты высокими концентрациями субстрата и гидрохинона позволило предположить наличие вблизи активного центра фермента регуляторного участка связывание с которым субстратов может повышать или понижать его активность.

3.4. КИНЕТИКА СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ ДВУХ БЫСТРО ОКИСЛЯЕМЫХ СУБСТРАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ (О-ДИАНИЗИДИН И ГИДРОХИНОН)

Органические субстраты, связываясь с пероксидазой, могут оказывать влияние на спектр поглощения фермента. По спектральным изменениям субстраты пероксидазы разделяют на два типа [Paul, Ohlsson, 1978]: 1) тип гидрохинона, при добавлении которого происходит несимметричное уширение полосы Core (403 нм) и уменьшение поглощения в диапазоне 570–630 нм; 2) тип резорцина, при добавлении которого увеличивается поглощение в видимой области спектра, а полоса Core сдвигается в красную область. Гидрохинон и резорцин конкурируют за место связывания в активном центре пероксидазы. Гидрохинон связывается с пероксидазой с $K_s = 4,6$ мМ [Paul, Ohlsson, 1978].

Гемин в пероксидазе недоступен ароматическим соединениям, а при pH, близких к нейтральным, исключается контакт даже для малых ионов из раствора [Савицкий, 1979].

Кинетические схемы реакций пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов пероксидазы (ферроцианида калия [Chance, 1949b], NADH [Лебедева, Угарова, 1997], аскорби-

новой кислоты [Рогожин, Верхотуров, 1997]) включают стадии комплексообразования субстрата с промежуточными формами фермента.

При окислении быстро окисляемого субстрата *o*-дианизидина промежуточные радикалы субстратов пероксидазы, образованные в реакции с E_1 , восстанавливают образовавшийся E_2 до нативного фермента [Лебедева и др., 1977]. При проведении этой реакции в среде не найдено свободных радикалов [Claiborow, Fridovich, 1979], поэтому высказывалось предположение, в котором допускалось комплексообразование E_2 с радикалом полуокисленного субстрата. Предполагалось, что образовавшийся радикал может не выходить в раствор, а оставаться на ферменте, образуя фермент-субстратный комплекс. Лебедевой и Угаровой предположено [Лебедева, Угарова, 1996], что комплекс пероксидазы с полуокисленным *o*-дианизидином является частицей, эффективно окисляющей другие субстраты пероксидазы при их совместном присутствии, что приводит к активации окисления второго субстрата. Механизм этого явления недостаточно изучен.

Изучив особенности протекания реакций совместного окисления в присутствии медленно и быстро окисляемых субстратов, нами в дальнейшем были изучены реакции совместного окисления быстро окисляемых субстратов (*o*-дианизидин и гидрохинон).

В реакциях окисления *o*-дианизидина с гидрохиноном последний определял порядок окисления субстратов [Рогожин, Верхотуров, 1999в]. При этом окисление *o*-дианизидина не наблюдалось до полного превращения гидрохинона. При высокой концентрации гидрохинон ингибировал реакции индивидуального и совместного с *o*-дианизидином окисления за счет присоединения двух и более молекул гидрохинона к фермент-субстратному комплексу (рис. 14). Количество молекул гидрохинона, ингибирующих фермент, зависело от pH, что возможно, вызвано уменьшением субстратсвязывающего участка активного центра фермента при кислых pH. При pH 5-7 в присутствии *o*-дианизидина скорость пероксидазного окисления гидрохинона возрастала (табл. 8). Активатор не влиял на величину k_{cat} , понижая значение K_m для гидрохинона, что характерно для синергической активации (рис. 15). При данном типе активации связывание эффектора с активным центром увеличивает сродство фермента к субстрату.

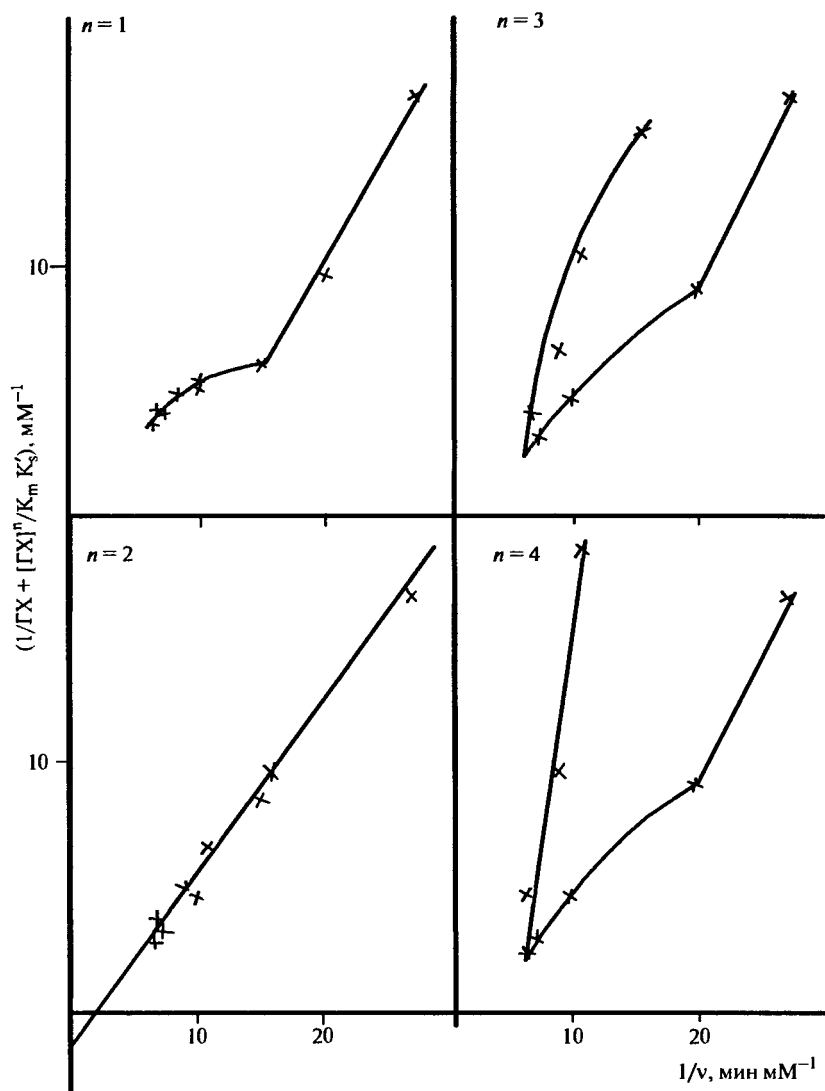


Рис. 14. Линеаризация экспериментальных данных по кинетике пероксидазного окисления гидрохинона в условиях ингибирования ферментативной реакции его избытком. рН 6,0; 0,1 М натрий-фосфатный буфер; пероксидаза — 2 нМ; H_2O_2 — 0,32 мМ; гидрохинон — 0,11–1,6 мМ.

При рН 4,0 и 4,5 *o*-дианизидин увеличивал скорость пероксидазного окисления гидрохинона, активируя фермент по смешанному типу, оказывая влияние как на его связывание, так и превра-

Таблица 8

Величины каталитических констант совместного пероксидазного окисления
о-дианизидина и гидрохинона

pH	K'_s , мкМ	n	α	β	K_a , мкМ
4,0	850 ± 50	1	2,33	1,37	39 ± 4
4,5			0,31	0,47	27 ± 2
5,0	410 ± 35	1	0,16	1,00	47 ± 4
5,5			0,07	1,00	250 ± 20
6,0	$0,08 \pm 0,01$	2	0,31	1,00	68 ± 5
6,5			0,32	1,00	31 ± 3
7,0	$0,06 \pm 0,01$	2	0,42	1,00	28 ± 2

шение (табл. 8). По-видимому, гидрохинон и о-дианизидин могут взаимно влиять на процесс связывания в активном центре фермента. При этом предварительное связывание о-дианизидина улучшает последующее связывание гидрохинона, ускоряя процесс его пероксидазного окисления. При окислении гидрохинона в присутствии ферроцианида последний не влиял на его пероксидазное окисление. При этом окисление ферроцианида не

происходило до тех пор, пока полностью не окислялся весь гидрохинон. По-видимому это происходило из-за того, что гидрохинон и ферроцианид связываются в активном центре пероксидазы в одном и том же месте. Поэтому предварительное связывание гидрохинона препятствовало последующему связыванию, а следовательно, и окислению ферроцианида.

На основании проведенных исследований гидрохинон можно было отнести к группе быстро окисляемых субстратов пероксидазы, скорость окисления которого возрастает при кислых pH. Поэтому при совместном присутствии в среде гидрохинона и о-дианизидина, после-

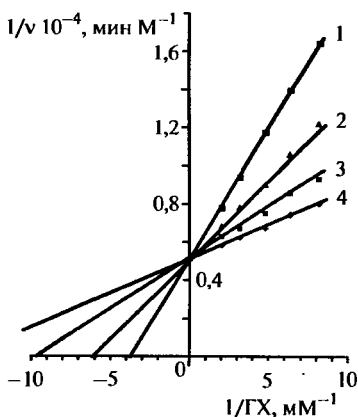


Рис. 15. Зависимости обратных начальных скоростей пероксидазного окисления гидрохинона в присутствии о-дианизидина, мкМ; 1—0, 2—4,3; 3—8,6; 4—17,2; пероксидаза — 0,2 нМ; перекись водорода — 0,32 мМ; pH 5,0.

дний образует комплекс с ферментом, в котором полуокисленный *o*-дианизидин способен ускорить окисление гидрохинона в 3–10 раз и это наблюдается до момента его полного окисления. При этом индивидуальное окисление гидрохинона происходит без образования фермент-субстратного комплекса с полуокисленным субстратом.

Таким образом, исследование реакций совместного окисления субстратов позволило выявить корпоративные взаимодействия между субстратами пероксидазы, что проявлялось в упорядоченности механизмов пероксидазного окисления. При этом индивидуальные особенности в строении субстратов определяли порядок их связывания в области активного центра фермента и последующую роль в каталитическом процессе.

Выявлено, что при окислении медленно окисляемых субстратов, таких как аскорбиновая кислота, в механизме действия пероксидазы заложен сложный регуляторный механизм, имеющий биологическое значение. В основе этого механизма лежит способность самих субстратов регулировать процесс окисления. При этом аскорбиновая кислота, являющаяся основным антиоксидантом растений, может активировать реакции собственного пероксидазного окисления. Предложено, что данный регуляторный механизм обеспечивает выполнение избирательной антиоксидантной функции пероксидазы в растениях. Установлено биологическое значение эффекта активации пероксидазы в реакциях окисления медленно окисляемого субстрата в присутствии быстро окисляемого и ингибирование активности фермента высокими концентрациями субстрата. Выявленные закономерности позволяют понять механизм действия большого количества соединений, используемых в предпосевной обработке семян и обладающих стимулирующим, ретардантным, ингибирующим действием в отдельности, а также в различных сочетаниях. Пероксидаза входит в состав комплекса ферментов, катализирующих окисление различных соединений, используемых в аэробных метаболических процессах, интенсивность которых возрастает в процессе набухания и прорастания семян. До сих пор являются спорными вопросы относительно эффектов активирования всхожести семян низкими концентрациями соединений и механизмы понижения всхожести семян высокими концентрациями веществ. На основании полученных данных мы предложили механизм участия пероксидазы в этих процессах. Поскольку фермент является показателем проте-

кания аэробных метаболических процессов в семенах, активность фермента увеличивается при прорастании и можно считать, что понижение активности пероксидазы служит критерием углубления состояния покоя семян. Поэтому аскорбиновая кислота и гидрохинон в высоких концентрациях понижают активность пероксидазы, могут способствовать переключению аэробных метаболических процессов на анаэробные, что будет проявляться в углублении покоя семян и понижения всхожести. Низкие концентрации субстратов пероксидазы при их совместном присутствии, напротив, способны активировать фермент, увеличивая скорость протекания аэробных метаболических процессов, обеспечивая переход семян из покоя в активное состояние, увеличивая их энергию прорастания и всхожесть. Предложено, что при совместном присутствии в среде гидрохинона и *o*-дианизидина, последний образует комплекс с ферментом, в котором полуокисленный *o*-дианизидин способен ускорить окисление гидрохинона в 3–10 раз и это проявляется до его полного окисления. Индивидуальное окисление гидрохинона происходит без образования фермент-субстратного комплекса с полуокисленным субстратом. Данный механизм может быть использован в растениях для окисления различных фенолов и, возможно, лигнина.

3.5. ВЛИЯНИЕ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ МЕДЛЕННО И БЫСТРО ОКИСЛЯЕМЫХ СУБСТРАТОВ

Интерес к механизму действия пероксидазы вызван еще и тем, что фермент способен катализировать окисление органических соединений не только перекисью водорода, но и кислородом воздуха [Угарова и др., 1981]. К оксидазным субстратам пероксидазы относится индолил-3-уксусная кислота (ИУК), однако ее роль в регулировании реакций пероксидазного окисления не изучена [Savitsky et al., 1999; Gazarian et al., 1998; Gazarian et al., 1999].

Пероксидаза катализирует окисление индолил-3-уксусной кислоты как в присутствии, так и в отсутствие перекиси водорода [Metodiewa et al., 1992; Park, Park, 1987; Pieres, 1992]. В процессе оксидазного окисления ИУК образуются супероксид анион-радикал и катион-радикал ИУК, последний в кислой среде декарбоксилируется, превращаясь в радикал скатола [Gazarian, 1998; Савицкий и др., 1998]. Предложено, что пероксидаза способна

одновременно связывать как перекись скатола, так и молекулу ИУК. Высказывается предположение, что на поверхности белка существует центр специфического связывания ауксина, отличающийся от активного центра, расщепляющего перекись водорода или органическую гидроперекись [Савицкий и др., 1998]. С помощью компьютерных методов показано, что пероксидазы растений и ауксин-связывающие белки содержат участки сходной структуры. При этом эти участки формируют основную часть дистального домена пероксидаз растений, и один из них непосредственно соответствует последовательности, координирующей гем с дистальной стороны активного центра [Савицкий и др., 1998]. По данным антигенного картирования пероксидазы хрена установлено, что в состав активного центра фермента входят несколько функционально важных аминокислотных остатков: Arg 38, Phe 142 и 143, которые формируют канал доступа ароматических субстратов к активному центру пероксидазы хрена [Аммосова и др., 1997]. Установлен молекулярный механизм расщепления перекиси водорода в активном центре пероксидаз растений [Schuller et al, 1996; Gajhede et al, 1996]. Показано, что в катализе фермента участвуют железо (III) протопорфирина IX и два дистальных аминокислотных остатка — His 42 и Arg 38. Однако до сих пор существуют сложности в предсказании субстратной специфичности пероксидазы хрена, недостаточно изучены механизмы пероксидазного окисления быстро и медленно окисляемых органических субстратов фермента. Поэтому нами было изучено участие индолил-3-уксусной кислоты в механизме пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты, а также, по возможности, мы постарались раскрыть основные закономерности этого каталитического процесса.

3.5.1. ВЛИЯНИЕ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Исследование влияния ИУК на реакции пероксидазного окисления АК позволило установить [Рогожин, Рогожина, 2002], что ауксин ингибирует фермент по конкурентному типу при связывании в активном центре фермента одной молекулы аскорбиновой кислоты (рис. 16, а). Тогда как в реакциях пероксидазного окисления АК с участием двух и более молекул субстрата ИУК проявляла неконкурентный характер ингибирования (рис. 16, б).

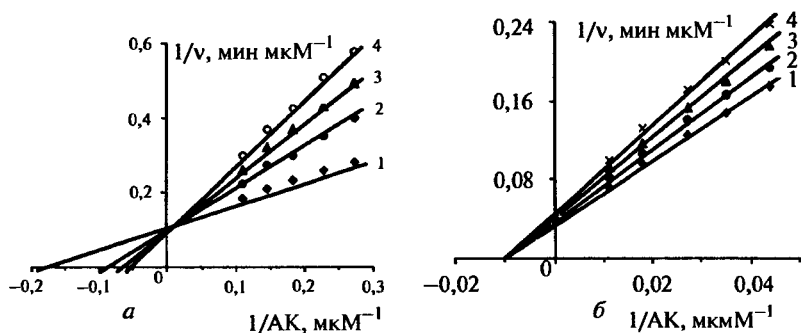


Рис. 16. Зависимости обратных начальных скоростей пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты при pH 5,0 (а) и 7,0 (б) от ее концентрации при различных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1-0, 2-5, 3-10, 4-15. Концентрации: а) пероксидаза — 99 нМ, аскорбиновая кислота — 3,65–9,12 мкМ; б) пероксидаза — 142 нМ, аскорбиновая кислота — 22,8–91,2 мкМ.

Связывание ИУК с пероксидазой в реакциях конкурентного ингибирования достаточно прочное и составляет 5,4–20,5 мкМ, что соизмеримо с величинами констант связывания аскорбиновой кислоты и *o*-дианизидина. В реакциях неконкурентного ингибирования ИУК связывается с пероксидазой в 3,2–10,2 раза лучше, чем связывание второй молекулы АК. При этом величины констант ингибирования в реакциях неконкурентного ингибирования при pH 4,5–7,0 для ИУК равны 27,3–34,6 мкМ.

В активном центре пероксидазы имеется несколько функциональных групп, принимающих участие в ферментативном катализе. Однако природа этих групп пока не установлена [Андреева, 1988]. Предполагается, что в области связывания ароматических субстратов могут располагаться аминокислотные остатки: Arg 38, Phe 142 и 143 [Аммосова и др., 1997]. При этом место связывания ИУК может находиться в структуре субдомена ауксин-связывающего участка вблизи Trp 117, который может принимать участие в связывании ИУК пероксидазами растений [Савицкий и др., 1998].

Исследование зависимостей $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ от pH для пероксидазного окисления с участием одной или двух молекул аскорбиновой кислоты не позволяет определить природу функциональных групп активного центра, принимающих участие в катализе АК (рис. 17). Аналогичная закономерность отмечается и на кривых $\lg K_i$ от pH для констант конкурентного и неконкурентного ингибирования пероксидазы ИУК (рис. 18). При этом величины констант конкурентного ингибирования практически не зависели от

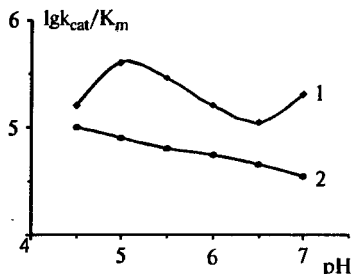


Рис. 17. pH-зависимости $\lg(k_{cat}/K_m)$ для реакций пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты при связывании с ферментом одной (1) и двух молекул аскорбиновой кислоты (2).

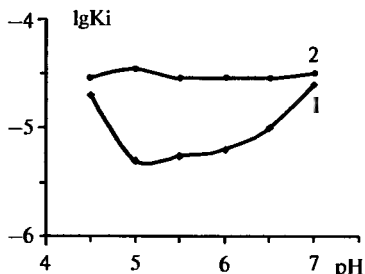


Рис. 18. Зависимости констант конкурентного (1) и неконкурентного (2) ингибирования пероксидазы индолил-3-уксусной кислотой в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты от pH.

pH. Тогда как значения констант неконкурентного ингибирования понижались в диапазоне pH 5–6 с возрастанием в кислой и нейтральной областях pH.

Таким образом, используя ИУК, можно предположить место локализации участка связывания молекул аскорбиновой кислоты в активном центре пероксидазы. По-видимому таким участком является дистальная область активного центра фермента. Связывание ИУК в этой области при низких концентрациях субстрата создает конкуренцию за участок связывания, проявляемую в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты, когда в активном центре фермента связывается, по крайней мере, одна молекула субстрата. При связывании двух и более молекул аскорбиновой кислоты с пероксидазой наблюдается ускорение реакции окисления аскорбиновой кислоты, что, возможно, вызвано кооперативными взаимодействиями между участками связывания этих двух молекул субстрата.

3.5.2. ВЛИЯНИЕ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ О-ДИАНИЗИДИНА И ГИДРОКИНОНА

Известно, что окисление ИУК пероксидазой протекает через образование тройного комплекса фермент-ИУК-кислород. Исследования механизма окисления ИУК пероксидазой растений показали, что на поверхности белковой глобулы должен располагаться участок связывания ауксина [Metodiewa et al., 1992; Park, Park, 1987; Pieres et al, 1992], который может находиться в составе

дистального домена фермента [Савицкий и др., 1998]. При этом считается, что активную роль в катализе пероксидазы принимает остаток Trp-117, удаленный на 8–9 Å от атомов азота порфиринового цикла, т.е. находящегося в зоне туннелирования электронов. При этом субдомен, включающий структурно сходные участки в дистальном домене пероксидазы, формируется в направлении от активного центра к поверхности дистального домена противоположной входу в активный центр.

Таким образом предполагается, что центр связывания ИУК может располагаться вдали от активного центра пероксидазы [Савицкий и др., 1998]. При этом оксидазное окисление ИУК может возрастать в присутствии гидрофобных аминокислот, тогда как полярные аминокислоты почти не оказывают влияние на каталитический процесс оксидазного окисления ауксина. Установлена прямая корреляция между гидрофобностью аминокислот и степенью их влияния на скорость окисления ИУК [Park, Park, 1987]. Однако в литературе отсутствуют данные по влиянию ИУК на пероксидазное окисление различных неорганических и органических субстратов, катализируемое пероксидазой растений. Возможно, что проведение таких исследований позволило бы определить расположение активного центра фермента на поверхности белковой глобулы, установить участки индивидуального связывания ИУК и исследуемых субстратов на ферменте.

Поэтому проведенное нами изучение реакций совместного пероксидазного окисления *o*-дианизидина, гидрохинона и ферроцианида калия в присутствии индолил-3-уксусной кислоты позволило установить следующие закономерности [Рогожина, Рогожин, 2003]. Ауксин ингибирует пероксидазу в реакции окисления *o*-дианизидина по конкурентному типу (рис. 19), тогда как в реакциях окисления гидрохинона при кислых значениях pH проявлялся неконкурентный характер ингибирования (рис. 20), переходящий при $\text{pH} > 6,5$ в смешанный тип (рис. 21). Присутствие ауксина не влияло на пероксидазное окисление ферроцианида калия.

Конкурентный тип ингибирования реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина ИУК позволяет предположить, что *o*-дианизидин и индолил-3-уксусная кислота связываются в одном и том же месте активного центра фермента. При этом связывание ИУК препятствует как связыванию, так и превращению *o*-дианизидина. Тогда как по отношению к гидрохинону тип ингибирования несколько другой. ИУК и гидрохинон связываются в различ-

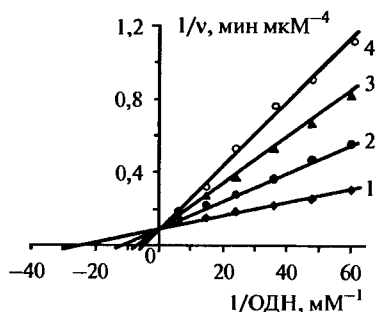


Рис. 19. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от его концентрации в двойных обратных координатах при различных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1-0, 2-10, 3-20, 4-30; пероксидаза — 0,56 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.

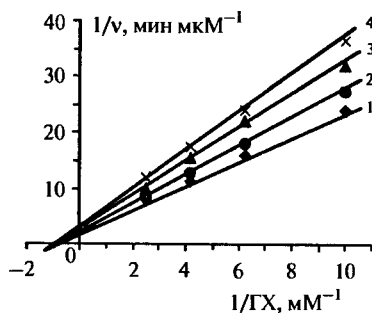


Рис. 20. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления гидрохинона от его концентрации в координатах Лайнуивера-Берка при различных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1-0, 2-20, 3-40, 4-60; пероксидаза — 4,0 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 5.

ных местах активного центра, однако, если индолил-3-уксусная кислота связывалась на поверхности фермента, то дальнейшее превращение гидрохинона становится невозможным. Это наблюдается вследствие удаленности мест связывания эффектора и субстрата или в результате конформационных изменений глобулы фермента при связывании ингибитора. Причем при pH 4,5–6,5 тип ингибирования неконкурентный, однако при увеличении pH он меняется и становится смешанным. При этом величина α увеличивалась ($\alpha > 1$), а β уменьшалась ($\beta < 1$). Изменение этих постоянных характеризует ухудшение связывания субстрата в 2,8–4,2 раза, т.е. при наличии ИУК происходило понижение сродства гидрохинона к активному центру фермента. Однако, если все-таки гидрохинон связался в активном центре, то дальнейшее его превра-

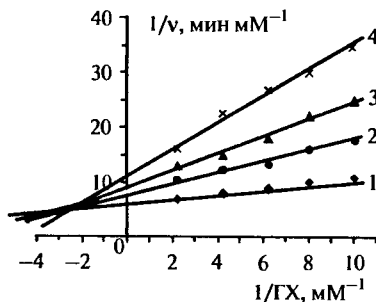


Рис. 21. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления гидрохинона от его концентрации в двойных обратных координатах при различных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1-0, 2-20, 3-40, 4-80; пероксидаза — 4,0 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,5.

щение ухудшалось в 1,7–5,3 раза. Связывание ИУК с пероксидазой зависело от pH среды. Так в реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизидина величина K_i при pH 4,5–7,0 изменялась в диапазоне от 9,6 до 0,72 мкМ, т.е. с возрастанием pH сродство ингибитора к ферменту повышалось в 13,3 раза. Тогда как в реакциях окисления гидрохинона величина K_i в этом же диапазоне pH изменялась от 113 до 17 мкМ, т.е. константа ингибирования понижалась в 6,6 раза. При этом эффективность связывания ИУК с пероксидазой, например, при pH 4,5 и 7,0 лучше связывания *o*-дианизидина в 4,2 и 20,8 раз, а гидрохинона — 5,8 и 8,8 раз соответственно. В реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизидина связывание ИУК с ферментом при pH 4,5 и 7,0 было в 11,8 и 23,6 раза соответственно эффективнее, чем в реакциях окисления гидрохинона. По-видимому на сродство ингибитора к ферменту оказывает влияние природа субстрата. Причем субстраты, имеющие близкую с ИУК полярность, значительно повышали эффективность связывания ингибитора с пероксидазой. Аналогичные зависимости были получены при изучении связывания ИУК в присутствии гидрофобных и полярных аминокислот [Park, Park, 1987]. Причем увеличение гидрофобности аминокислоты повышало сродство ауксина к ферменту. Поэтому преимущественным местом связывания ИУК и *o*-дианизидина в активном центре пероксидазы, по-видимому, должна быть гидрофобная область [Савицкий и др., 1998]. Тогда как для гидрохинона местом связывания является область на поверхности фермента, содержащая большее число полярных или заряженных аминокислотных остатков [Лебедева, Угарова, 1996]. Подтверждением различных мест связывания *o*-дианизидина и гидрохинона в активном центре пероксидазы служат данные по совместному пероксидазному окислению этих субстратов. На основании полученных данных можно предположить, что ИУК являясь оксидазным субстратом пероксидазы, способна связываться в составе дистального домена активного центра фермента, ингибируя протекание пероксидазных реакций. При этом пероксидаза будет выполнять роль высокоспецифичной оксигеназы ауксина.

Из pH-зависимостей $\lg k_{cat}/K_m$ для *o*-дианизидина и гидрохинона видно, что формы кривых имеют сложную зависимость, затрудняющие определение природы ионогенных групп нативного фермента, принимающих участие в катализе этих субстратов (рис. 22). По-видимому, ионогенные группы, принимающие участие в каталитическом процессе пероксидазы, находятся в ок-

ружении гидрофобных аминокислотных остатков, что проявляется в затруднении определения pK_a этих функциональных групп на pH-зависимостях каталитических констант реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина и гидрохинона, поскольку сами субстраты содержат функциональные группы с высокими значениями pK_a и в исследованном диапазоне pH могут находиться только в протонированной форме, например, pK_a групп гидрохинона 9,85 и 11,4 [Досон и др., 1991], а *o*-дианизидина — 3,6 и 4,7 [Muller, Ottolenghi, 1966]. Данные утверждения подтверждаются исследованиями по антигенному картированию пероксидазы хрена [Аммосова и др., 1997]. Выявленные эпитопы содержали несколько функционально важных остатков: His-42 и Arg-38, входящих в активный центр пероксидазы, вблизи которых находятся гидрофобные аминокислотные остатки (Phe-142 и 143), формирующие канал доступа ароматических субстратов к активному центру фермента.

Из pH-зависимостей $\lg K_i$ в реакциях окисления *o*-дианизидина определяются две ионогенные группы с pK_a 4,7 и 6,5 (рис. 23, кривая 1), а гидрохинона — одна ионогенная группа с pK_a 6,8 (рис. 23, кривая 2). Проявление этих групп, по-видимому, вызвано наличием в составе молекулы индолил-3-уксусной кислоты карбоксильной группы с pK_a 4,5 [Досон и др., 1991] протонирование и депротонирование которой позволяет выявить две ионогенные функциональные группы активного центра пероксидазы, принимающие участие в пероксидажном окислении *o*-дианизидина и одну — в окислении гидрохинона.

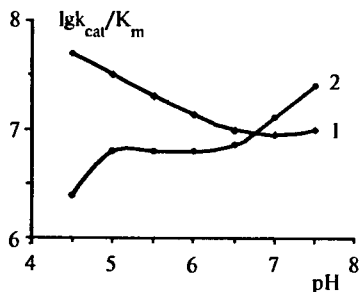


Рис. 22. pH-Зависимости $\lg(k_{cat}/K_m)$ для реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина (1) и гидрохинона (2).

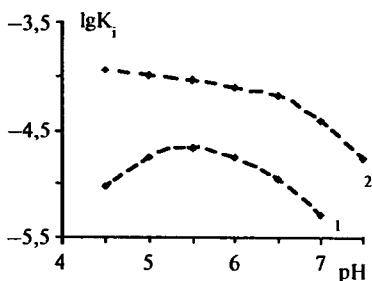


Рис. 23. pH-Зависимости константы ингибирования реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина (1) и гидрохинона (2) индолил-3-уксусной кислотой. Кривые являются теоретическими для $pK_a(\text{ОДН} + \text{иук}) = 4,7$, $K_{a(\text{lim})} = 23,8$ мкМ; $pK_B(\text{ОДН} + \text{иук}) = 6,5$, $K_{B(\text{lim})} = 22,6$ мкМ; $pK_B(\text{ГХ} + \text{иук}) = 6,8$, $K_{B(\text{lim})} = 104$ мкМ.

Выявленные эффекты влияния ИУК на пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты, гидрохинона и *o*-дианизидина, катализируемое пероксидазой, имеют важное биологическое значение. ИУК может регулировать пероксидазное окисление медленно окисляемого субстрата, имея специфичный участок связывания в составе дистального домена активного центра пероксидазы. По-видимому, избирательность типов ингибирования пероксидазы ИУК обусловлена специализированностью аукусина служить оксидазным субстратом фермента. При этом ИУК может изменять направленность реакций пероксидазы с одного типа на другой, меняя специфичность фермента с пероксидазного на оксидазный, превращая пероксидазу в высокоспецифичную оксигеназу, генерирующую свободные радикалы необходимость в которых может возникать у растений в процессе развития. При этом ИУК может выполнять роль «триггера» в реакциях окисления, катализируемых пероксидазой. Реализация действия аукусина возможно проявляется при выходе семян из состояния вынужденного покоя. В этот период в семенах резко возрастает активность пероксидазы, которая способна активировать процессы прорастания. Возможным механизмом действия фермента в этих процессах может быть его способность к генерированию свободных радикалов, необходимых на конечных этапах эмбриогенеза для активизации механизмов прорастания.

3.6. ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ (АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА, КВЕРЦЕТИН, ДИГОКСИН) НА РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ О-ДИАНИЗИДИНА

К антиоксидантам относятся вещества, способные подавлять образование свободных радикалов в живых организмах. Антиоксиданты можно разделить на низко- и высокомолекулярные соединения [Кения и др., 1993]. К группе низкомолекулярных антиоксидантов относятся мочевины, мочевая кислота, глутатион, аскорбиновая кислота, кверцетин, дигоксин и др. [Кения и др., 1993; Дубинина, Шугалей, 1993; Владимиров, Арчаков, 1972]. К группе высокомолекулярных: каталаза, СОД, пероксидаза.

Функциональная роль аскорбиновой кислоты в метаболических процессах связана с образованием промежуточных продуктов ион-радикалов семихинонного типа при ее окислении [Руг-

ге, Блюменфельд, 1965]. Высказано предположение, что способность АК отдавать электроны соответствующим акцепторам и образовывать ион-радикалы лежит в основе участия аскорбиновой кислоты в окислительно-восстановительных процессах, причем АК может участвовать в транспорте электронов и окислении пиридиновых коферментов [Рутге, Блюменфельд, 1965].

Известно, что окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту кроме специализированной аскорбатоксидазы [Paciolla et al. 1991] могут катализировать и другие оксидазы: цитохромоксидаза, фенолоксидаза, пероксидаза [Матусис, 1974]. Однако окисление аскорбиновой кислоты пероксидазой мало изучено в связи с тем, что АК является медленно окисляемым субстратом фермента и данная реакция не имеет практического значения. Хотя известно, что при одновременном присутствии в растворе различных субстратов пероксидазы (медленно и быстро окисляемых) наблюдаются эффекты взаимной активации и ингибирования. При этом ингибирование либо имеет конкурентный характер, либо связано с дифференцированным окислением субстратов в присутствии пероксидазы [Лебедева, Угарова, 1996].

Пероксидаза совместно с низкомолекулярными антиоксидантами (токоферолы, строфантин, дигоксин, кверцетин, аскорбиновая кислота и др.) входит в состав антиоксидантной системы живых организмов, регулирующих действие активных форм кислорода. Поэтому нами были изучены реакции совместного пероксидазного окисления некоторых антиоксидантов (дигоксин, кверцетин и аскорбиновая кислота) с *o*-дианизидином [Рогожин, Верхотуров, 1998в]. Показано, что антиоксиданты могут ингибировать пероксидазное окисление быстро окисляемого субстрата, катализируемое пероксидазой хрена. Дигоксин, связываясь с фермент-субстратным комплексом в котором присутствует стабильный полуокисленный продукт *o*-дианизидина, ингибировал пероксидазу по антиконкурентному типу в реакциях индивидуального и совместного с ферроцианидом окисления *o*-дианизидина при всех изученных значениях pH (рис. 24). Проявляя антиоксидантные свойства, дигоксин подавлял реакции свободнорадикального окисления *o*-дианизидина. Причем сродство ингибитора к ферментсубстратному комплексу в реакциях совместного окисления было в 5–6 раз выше, чем в реакциях индивидуального окисления *o*-дианизидина и зависело от pH (табл. 9).

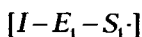
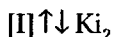
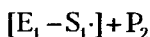
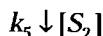
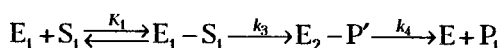
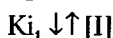
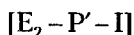
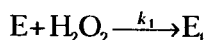
Таблица 9

Значения констант Михаэлиса и ингибирования пероксидазного окисления субстратов пероксидазы хрена

pH	$K_m(\text{ОДН})$, мкМ	$K_m(\text{АК})$, мкМ	$K_m(\text{ОДН}+\text{АК})$, мкМ	$K_m(\text{ОДН}+\text{ДГ})$, мкМ	$K_m(\text{ОДН}+\text{ДГ}+\text{ФК})$, мкМ	$K_m(\text{ОДН}+\text{КВ})$, мкМ	α	β
5,0	40 ± ± 4	340 ± ± 30	37 ± ± 4	—	—	2,5 ± ± 0,2	5,6 ± ± 0,4	0,24 ± ± 0,02
5,5	35 ± ± 3	170 ± ± 15	27 ± ± 3	298 ± ± 12	150 ± ± 6	2,7 ± ± 0,2	4,4 ± ± 0,3	0,22 ± ± 0,02
6,0	30 ± ± 2	190 ± ± 10	25 ± ± 2	244 ± ± 8	120 ± ± 5	2,9 ± ± 0,2	2,3 ± ± 0,2	0,24 ± ± 0,02
6,5	20 ± ± 2	150 ± ± 15	27 ± ± 3	193 ± ± 5	95 ± ± 4	—	—	—
7,5	15 ± ± 1	120 ± ± 10	18 ± ± 2	177 ± ± 4	65 ± ± 2	—	—	—

Для объяснения кинетики ингибирования пероксидазы дигоксином в реакции индивидуального и совместного окисления *o*-дианизидина и ферроцианида может быть предложена схема 6.

схема 6



I — дигоксин, $E_2 - P' - I$, $I - E_1 - S_1$ — комплексы дигоксина с полуокисленным *o*-дианизидином.

Тогда как кверцетин ингибировал пероксидазу по смешанному типу (рис. 25). При связывании с ферментом кверцетин понижал сродство и эффективность превращения *o*-дианизидина.

Смешанный тип ингибирования вызван конкуренцией двух субстратов пероксидазы один из которых является медленно окис-

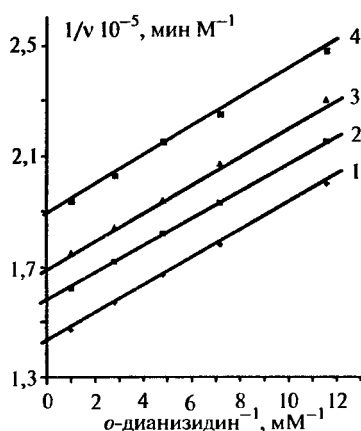


Рис. 24. Зависимость начальной скорости окисления *о*-дианизидина от его концентрации при различных концентрациях дигоксина, мкМ: 1-0, 2-27,5, 3-41,0, 4-69,0. Концентрации: пероксидаза — 0,13 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; рН 5,0, 0,1 М натрий-ацетат.

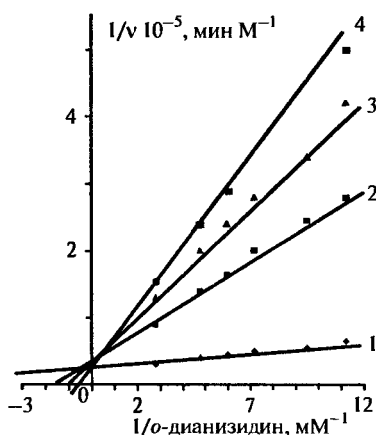
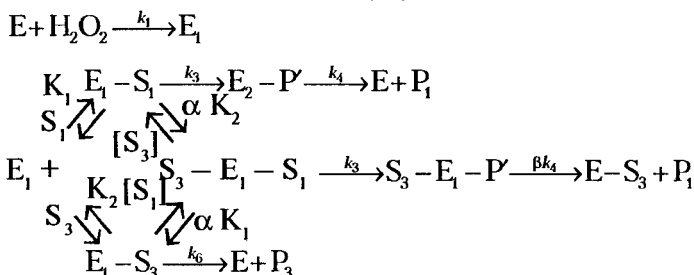


Рис. 25. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *о*-дианизидина от его концентрации при различных концентрациях кверцетина, мкМ: 1-0, 2-24,8, 3-49,6, 4-74,0. Концентрации: пероксидаза — 0,26 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; рН 5,5, 0,1 М натрий-ацетат.

ляемым (кверцетин), а другой быстро окисляемым (*о*-дианизидин) (схема 7).

схема 7



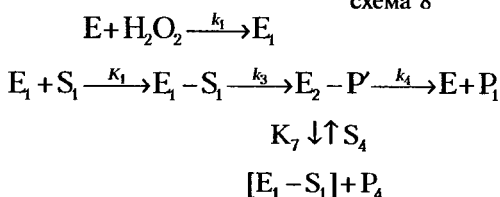
S_3 — кверцетин; $E_1 - S_3$ — комплекс кверцетина с E_1 ; $S_3 - E_1 - S_1$, $S_3 - E_1 - P'$ — комплексы *о*-дианизидина и полуокисленного *о*-дианизидина с E_1 и кверцетином.

Наблюдаемый эффект является следствием того, что кверцетин является медленно окисляемым субстратом пероксидазы скорость окисления которого в присутствии быстро окисляемого субстрата возрастает, что и создает конкуренцию.

Установлено, что при совместном присутствии в реакционной среде АК и *o*-дианизидина отмечается их дифференцированное пероксидазное окисление при котором окисление *o*-дианизидина не происходило до полного превращения аскорбиновой кислоты. При этом АК окисляется полуокисленным промежуточным фермент-субстратным комплексом пероксидазы аналогично ферроцианиду.

На основании полученных данных совместное пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты и *o*-дианизидина можно описать следующей схемой 8.

схема 8



S_4 — аскорбиновая кислота.

Скорость пероксидазного окисления АК в присутствии *o*-дианизидина может превышать скорость индивидуального окисления аскорбиновой кислоты более, чем на два порядка, а *o*-дианизидина — в 1,5–2,0 раза.

Таким образом, трудно окисляемый субстрат, каким является аскорбиновая кислота, по-видимому, эффективнее окисляется радикалами быстро окисляемого субстрата *o*-дианизидина, чем соединениями E_1 и E_2 пероксидазы. При этом на кривых pH-зависимостях $\lg k_{cat}$ реакций как индивидуального, так и совместного с *o*-дианизидином окисления аскорбиновой кислоты проявлялась ионогенная группа с pK_a — 6,5 (рис. 26).

На основании исследования характера ингибирования пероксидазы дигоксином и кверцетином в реакциях окисления *o*-дианизидина можно высказать предположения о строении активного центра фермента. Оба ингибитора могут связываться в актив-

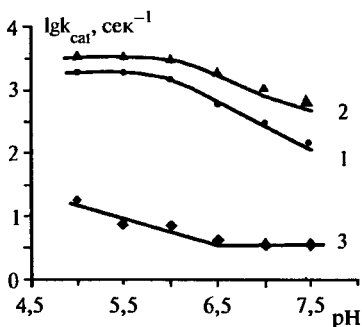


Рис. 26. Зависимость логарифма каталитических констант индивидуального пероксидазного окисления *o*-дианизидина (1), аскорбиновой кислоты (2) и совместного окисления аскорбиновой кислоты и *o*-дианизидина (3) от pH.

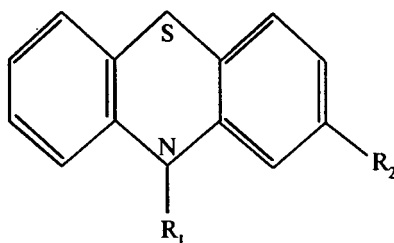
ном центре пероксидазы, оказывая влияние на последующее течение каталитического процесса. Связывание дигоксина возможно только с фермент-субстратным комплексом, что проявляется в последующем замедлении реакции окисления *o*-дианизидина. Тогда как кверцетин может связываться со свободным ферментом, причем предварительное связывание кверцетина в области активного центра пероксидазы ухудшает последующее связывание и превращение *o*-дианизидина. Природа ингибирования пероксидазных реакций окисления *o*-дианизидина позволяет высказать предположение о размерах субстратсвязывающей площадки в области активного центра фермента.

Взаимное влияние субстратов, а также регуляторное действие ингибиторов и активаторов возможно если активный центр пероксидазы представлен в виде протяженной субстратсвязывающей области, состоящей из нескольких участков, где могут одновременно связываться как субстраты, так и эффекторы. Причем связывание последних проявляется в регулировании активности пероксидазы.

Таким образом, установлена регуляторная роль антиоксидантов в пероксидажном окислении быстро окисляемых субстратов, катализируемых пероксидазой. Выявленные закономерности позволяют предположить, что увеличение содержания антиоксидантов в исследуемом биообъекте может ингибировать пероксидазу, тогда как возрастание содержания пероксидазы будет способствовать быстрому их окислению.

3.7. ФЕНОТИАЗИНЫ (ХЛОРПРОМАЗИН, ТРИФТАЗИН, ТИОПРОПЕРАЗИН) В ПЕРОКСИДАЗНЫХ РЕАКЦИЯХ

Производные фенотиазина представляют собой конденсированную гетероциклическую систему, состоящую из шестичленного гетероцикла тиазина и двух ядер бензола [Беликов, 1985]:



Установлено, что в зависимости от характера заместителя у атома азота в положениях 2 и 10, производные фенотиазина могут обладать противогистаминным, холинолитическим, седативным и нейролептическим действием.

Ультрафиолетовые спектры 10-алкилпроизводных фенотиазина в этаноле имеют по два максимума поглощения в области 290–330 нм; у 10-ацилпроизводных наблюдается гипсохромное смещение обоих максимумов. ИК-спектры в области 4000–250 см⁻¹ насчитывают по 20–25 полос поглощения [Азамасцев, Яскина, 1975].

Производные фенотиазина легко окисляются в том числе и кислородом воздуха, а продукты их окисления имеют окраску. Реакции эти в большинстве своем мало специфичны и почти не изучены. Предполагается, что окрашенные вещества образуются за счет окисления атома серы, а также за счет окисления ядра фенотиазина в положениях 3 и 6. В зависимости от характера окислителя и условий выполнения реакции образуется смесь продуктов окисления, например, 9-S-оксид и 9,9-диоксид [Беликов, 1985].

Пероксидазное окисление хлорпромазина, трифтазина и тиопроперазина недостаточно изучено. Не исключено, что исследование реакций пероксидазного окисления этих фенотиазинов позволит разобраться в динамике их превращения в живых организмах и раскрыть особенности фармакологического действия препаратов.

3.7.1. ПЕРОКСИДАЗНЫЕ РЕАКЦИИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО И СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОТИАЗИНОВ

Спектр хлорпромазина в 0,1 М Na-фосфатном буфере при pH 7,0 имеет три выраженных максимума поглощения в УФ-области (215, 254 и 305 нм) (рис. 27) [Рогожин, Верхотуров, 1998a]. Для максимума поглощения при 254 нм нами определен молярный коэффициент поглощения (29 мМ⁻¹ см⁻¹), что соответствует литературным данным [Азамасцев, Яскина, 1975]. В процессе пероксидазного окисления в спектре поглощения хлорпромазина появляются три максимума поглощения: при 220, 275 и 526 нм (рис. 27). Известно, что в процессе окисления хлорпромазина появляются продукты окисления, имеющие нестабильную розовую окраску [Беликов, 1985]. Аналогичные изменения наблюдали и мы при проведении реакции пероксидазного окисления хлорпромазина, катализируемого пероксидазой хрена. В отсутствие

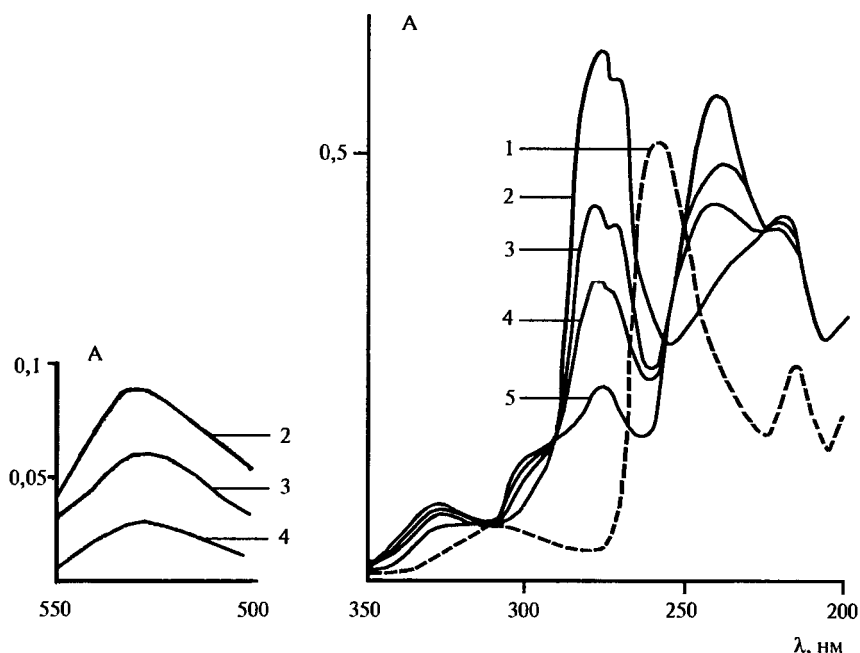


Рис. 27. Спектр поглощения хлорпромазина и продуктов его пероксидазного окисления в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 4,5. Время реакции, мин: 1-0; 2-2; 3-4; 4-6; 5-18. Концентрации: хлорпромазин — 17,2 мкМ, пероксидаза — 20 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ.

фермента реакция не наблюдалась. В течение первых минут проведения реакции спектр хлорпромазина изменялся — максимум поглощения при 254 нм полностью исчезал. Поэтому определение скорости пероксидазного окисления хлорпромазина в присутствии пероксидазы хрена проводили, регистрируя уменьшение поглощения светопоглощения при 254 нм.

Исследование индивидуальных реакций окисления хлорпромазина позволило отнести его к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы (k_{cat} измеренная в диапазоне pH 4,5–7,0 понижалась от 114 до 3,5 с⁻¹). При этом связывание хлорпромазина с пероксидазой зависело от pH и составляло 85–270 мкМ. На кривой pH-зависимости $\lg k_{\text{cat}}$ и $\lg(k_{\text{cat}}/K_m)$ определялась ионогенная группа с pK_a 6,0 (рис. 28, а и б, кривые 1, 1'). В щелочной области pH связывание хлорпромазина с ферментом в 2,5–3,0 раза лучше, чем в кислой среде. Предложено, что окисление хлорпромазина протекает по одноэлектронному механиз-

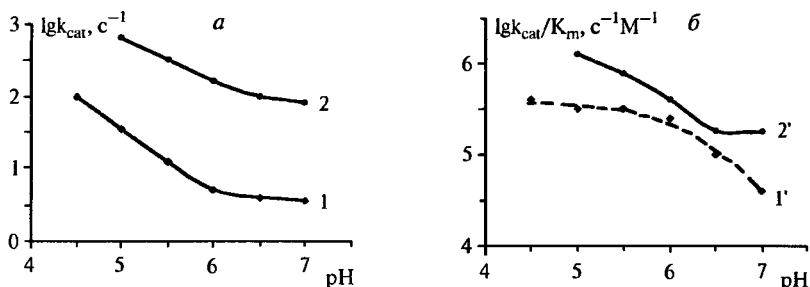


Рис. 28. pH-Зависимости $\lg k_{\text{cat}}$ (а) и $\lg (k_{\text{cat}}/K_m)$ (б) для реакций пероксидазного окисления аминазина (1, 1') и ферроцианида калия (2, 2'). Пунктирная кривая рассчитана с использованием значений $\text{p}K_a = 6,0$, $(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{lim}} = 4,75 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$.

му, характерному для пероксидазного окисления неорганических ионов. В реакции совместного окисления хлорпромазина и ферроцианида калия хлорпромазин ускорял пероксидазное окисление ферроцианида калия, увеличивая сродство субстрата к ферменту, но не влияя на величину каталитической константы в интервале pH 5–7 (рис. 29). На кривых pH-зависимостей $\lg K_a$ и $\lg \alpha$ определялись ионогенные группы с $\text{p}K_a = 5,75$ и $6,19$ соответственно, депротонирование которых улучшало связывание хлорпромазина с пероксидазой и увеличивало сродство фермента к ферроцианиду (рис. 30). При совместном присут-

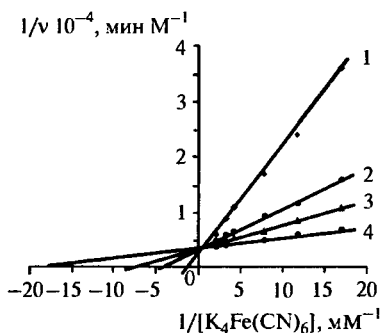


Рис. 29. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления ферроцианида калия в присутствии аминазина, мкМ: 1–0; 2–56; 3–84; 4–112; пероксидаза — 40 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; 0,1 М Na-фосфатный буфер pH 6,5.

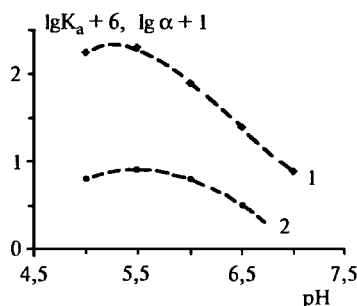


Рис. 30. pH-Зависимости $\lg K_a$ (1) и $\lg \alpha$ (2) для реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия в присутствии аминазина. Кривые являются теоретическими для $\text{p}K_{a(\text{ФР} + \text{АМ})} = 5,75$, $K_{a(\text{lim})} = 198 \text{ мкМ}$; $\text{p}K_{a(\alpha)} = 6,19$, $\alpha_{\text{lim}} = 0,828$.

ствии хлорпромазина и ферроцианида калия скорость пероксидазного окисления последнего возрастала за счет того, что хлорпромазин связывался в активном центре пероксидазы вблизи места связывания молекулы ферроцианида, стабилизируя промежуточный комплекс фермента с ферроцианидом.

На рис. 31 показаны спектры трифтазина и тиопроперазина в 0,1 М натрий-ацетатном буфере при pH 4,5 [Рогожина, Рогожин,

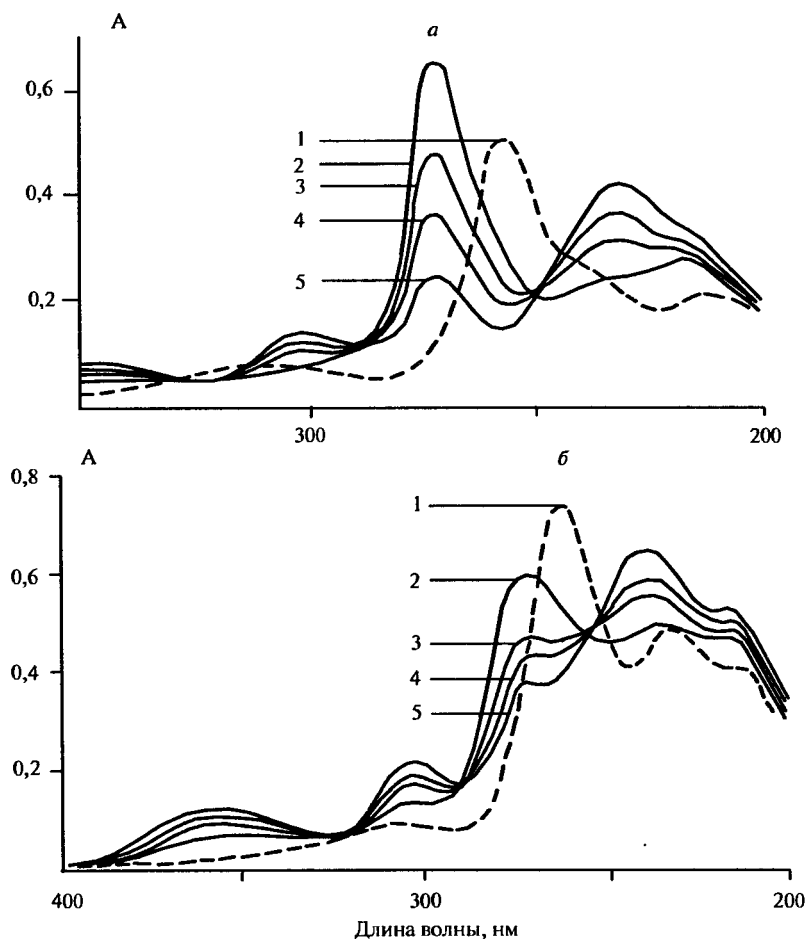


Рис. 31. Спектры поглощения трифтазина (а), тиопроперазина (б) и продуктов их пероксидазного окисления в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,5. Время реакции, мин: 1-0, 2-1,5, 3-3,5, 4-6,5, 5-19,5 (трифтазин); 1-0, 2-2,0, 3-5,5, 4-10,5, 5-37,0 (тиопроперазин). Концентрации: трифтазин — 17,4 мкМ; тиопроперазин — 19,0 мкМ; пероксидаза — 30,0 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ.

2002]. Видно, что в спектрах производных фенотиазина проявляются три выраженных максимума поглощения в УФ-области (ТФ — 215, 257, 310 нм; ТП — 235, 265, 310 нм). В процессе пероксидазного окисления в спектре поглощения трифтазина появляются три максимума поглощения при 232, 303, 350 нм, а тиопроперазина — 243, 305, 355 нм. В течение первых минут проведения реакции спектры трифтазина и тиопроперазина изменялись — максимумы поглощения при 257 и 265 нм полностью исчезали. Поэтому определение скорости пероксидазного окисления трифтазина и тиопроперазина в присутствии пероксидазы хрена проводили, регистрируя уменьшение поглощения светопоглощения для трифтазина при 257 нм, а тиопроперазина — при 265 нм. В отсутствие фермента реакции не наблюдались.

Реакции индивидуального пероксидазного окисления трифтазина и тиопроперазина характеризовались низкими значениями каталитических констант $0,3\text{--}124$ и $0,12\text{--}9,8\text{ с}^{-1}$ соответственно, что позволяет отнести их к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы. Величины K_m для трифтазина и тиопроперазина мало различаются и составляют соответственно $10\text{--}330$ и $22\text{--}196\text{ мкМ}$ в зависимости от рН. Значения K_m трифтазина и тиопроперазина при $\text{pH} > 6,0$ примерно такие же, как у *о*-дианизидина.

На кривых рН-зависимостей $\lg k_{\text{cat}}$ и $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ реакций пероксидазного окисления трифтазина (рис. 32) и тиопроперазина (рис. 33), определялись ионогенные группы с $\text{pK } 4,9, 5,6$ и $5,4, 4,7$ соответственно, депротонирование которых ухудшает каталитический процесс пероксидазного окисления соответственно трифтазина в 413 раз, а тиопроперазина в 82 раза.

При значениях $\text{pH} > 6,0$ имело место отклонение опытных кривых рН-зависимостей для $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ от теоретической для реакций пероксидазного окисления трифтазина и тиопроперазина, что, возможно, вызвано проявлением действия еще одной ионогенной группы свободного фермента, принимающей участие в связывании субстрата.

В отличие от хлорпромазина, у трифтазина и тиопроперазина, с увеличением рН значения K_m понижались. В кислых рН ($4,5\text{--}5,5$) трифтазин окислялся быстрее хлорпромазина в $1,5\text{--}3$ раза и в $9\text{--}12$ раз эффективнее тиопроперазина. Константа Михаэлиса трифтазина в $2\text{--}2,5$ раза больше, чем у хлорпромазина и в $1,5\text{--}3,5$ раза — тиопроперазина. Однако при $\text{pH} > 6,0$ величины K_m трифтазина и тиопроперазина понижались и становились соиз-

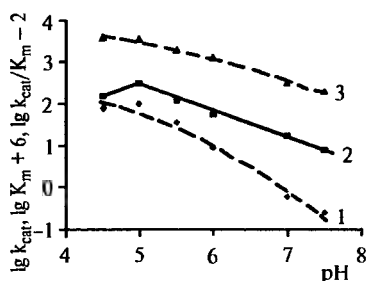


Рис. 32. pH-Зависимости $\lg k_{\text{cat}}$ (1), $\lg K_m$ (2) и $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ (3) для реакций пероксидазного окисления трифитазина. Пунктирные кривые рассчитаны с использованием значений $pK_a = 4,89$, $k_{\text{cat(lim)}} = 129 \text{ c}^{-1}$; $pK_a = 5,64$, $(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{lim}} = 51,8 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}\text{M}^{-1}$.

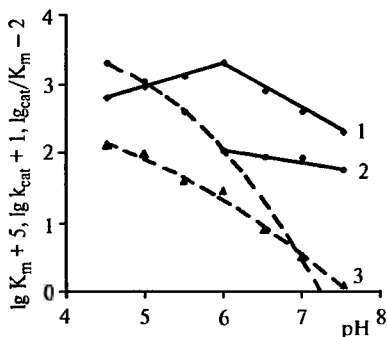


Рис. 33. pH-Зависимости $\lg K_m$ (1), $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ (2) и $\lg k_{\text{cat}}$ (3) для реакций пероксидазного окисления тиопроперазина. Пунктирные кривые являются теоретическими для $pK_a = 5,43$, $k_{\text{cat(lim)}} = 12,9 \text{ c}^{-1}$; $pK_a = 4,71$, $(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{lim}} = 30,5 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}\text{M}^{-1}$.

меримы с K_m для быстро окисляемого субстрата пероксидазы — *o*-дианизидина.

Низкие значения константы скорости окисления фенотиазин-ов, возможно, как в случае с НАДН и аскорбиновой кислотой в первую очередь обусловлены тем, что их окисление пероксидом водорода протекает по одноэлектронному механизму аналогично окислению неорганических субстратов пероксидазы. Поэтому при совместном окислении *o*-дианизидина и различных фенотиазин-ов фермент реализует различные пути переноса электрона с окисляемого субстрата выбор которых определяется доступностью функциональных групп субстрата каналам переноса электронов на поверхности белковой глобулы [Лебедева, Угарова, 1996]. Среди изученных фенотиазин-ов расположение функциональных групп хлорпромазина обеспечивает его преимущественное пероксидазное окисление по сравнению с *o*-дианизидином. При этом вначале полностью окислялся хлорпромазин, а затем наблюдалось окисление *o*-дианизидина.

При pH 4,0–5,5 тиопроперазин и *o*-дианизидин могли связываться в активном центре пероксидазы. При этом связывание тиопроперазина улучшало последующее связывание *o*-дианизидина, но замедляло скорость его пероксидазного окисления, что проявляется в антиконкурентном типе ингибирования. Т.е. тиопроперазин способен связываться только с фермент-субстратным комп-

лексом и не связывается со свободным ферментом. С возрастанием рН ($\text{pH} > 5,5$) происходило депротонирование одной из функциональных групп активного центра фермента и это способствовало переключению механизма переноса электронов с донора водорода *о*-дианизидина на преимущественное окисление донора электронов — тиопроперазин. Противоположный эффект наблюдался при совместном окислении *о*-дианизидина и трифтазина. Последний возможно и связывался в активном центре фермента, однако его окисление не происходило, поскольку реализовывался механизм окисления донора водорода — *о*-дианизидина.

3.7.2. ВЛИЯНИЕ СТРОФАНТИНА G НА КИНЕТИКУ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОТИАЗИНОВ

Ряд соединений, относящихся к стероидным гликозидам (дигоксин, строфантин и др.), не являются субстратами пероксидазы, так как не способны реагировать с промежуточными окисленными формами фермента (E_1 и E_2). Однако эти соединения обладают антиоксидантным действием. Стероидные гликозиды в химическом отношении родственны между собой и являются сложными органическими соединениями в составе которых углеводы (гликоны) и агликоны (генины) в основе имеют пергидрофенантренициклопентан к семнадцатому углеродному атому которого присоединяется ненасыщенное пятичленное, реже

Величины каталитических констант пероксидазного окисления

рН	Субстраты											
	тиопроперазин						хлорпромазин					
	K_m мкМ	k_{cat} с ⁻¹	K_s мкМ	α	β	тип акти- зации	K_m мкМ	k_{cat} с ⁻¹	K_s мкМ	α	β	тип инги- биро- вания
5,0	90	9,8	30	5,7	5,7	б/к	130	42	94	0,53	0,55	с.и.
5,5	110	4,3	18	6,6	6,6	б/к	77	24	79	0,74	0,71	с.и.
6,0	196	2,9	30	1,4	1,4	б/к	44	15	26	2,04	0,08	с.и.
7,0	40	0,35	84	0,30	1,3	с.а.	177	7,4	30			к.и.
7,5	22	0,12	125	0,55	2,9	с.а.	200	3,2	25			к.и.

Примечание. В таблице приняты следующие сокращения: б/к — бесконкурентные, к.и. — конкурентный тип ингибирования, н/к — неконкурентный тип

шестичленное лактонное кольцо. Стероидные гликозиды способны при взаимодействии с клеточными мембранами увеличивать их проницаемость [Богатский и др., 1960]. Они обладают высокой реактивностью за счет подвижности атома водорода агликона, который может образовать стабильный промежуточный радикал ингибитора [Кинтя и др., 1982], выполняя таким образом роль антиоксиданта в клетках.

Однако участие строфантина G в реакциях пероксидазного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов пероксидазы не изучено. Поэтому мы изучили влияние строфантина G на пероксидазное окисление медленно (хлорпромазин, тиопроперазин, трифтазин) и быстро (*o*-дианизидин) окисляемых субстратов пероксидазы хрена в широком диапазоне pH, предложив возможные механизмы активирования и ингибирования строфантинем G пероксидазы в реакциях пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов (табл. 10).

Показано, что строфантин G может связываться в активном центре фермента, влияя на процесс пероксидазного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов пероксидазы [Рогожин, Рогожина, 2000]. При этом проявлялась двойственность его действия в реакциях пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов пероксидазы. Например, в реакциях окисления тиопроперазина строфантин G активировал окисление. При

Таблица 10
субстратов пероксидазы в отсутствие и в присутствии строфантина G

трифтазин						<i>o</i> -дианизидин			
K_m мкМ	k_{cat} с ⁻¹	K_i мкМ	α	β	тип инги- биро- вания	K_m мкМ	k_{cat} с ⁻¹	K_i мкМ	тип инги- биро- вания
330	124	710			н/к	40	2500	178	а/к
150	38	715			н/к	35	3000	128	а/к
57	7,4	720			н/к	30	2200	108	а/к
21	0,7	510	1,5	0,75	с.и.	18	600	115	а/к
9,5	0,3	320	4,4	0,26	с.и.	20	150	98	а/к

ная активация, с.а. — смешанная активация, с.и. — смешанный тип ингибирования, а/к — антиконкурентный тип ингибирования.

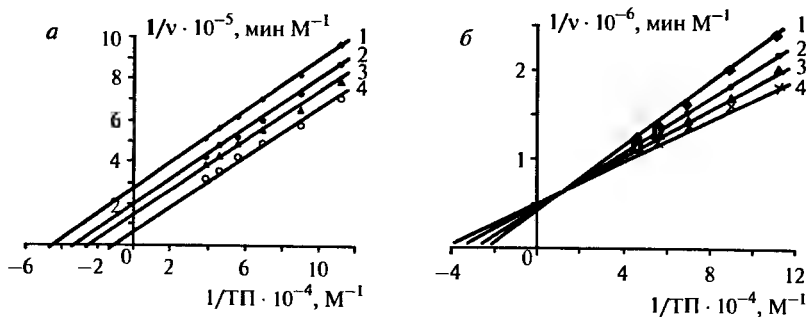


Рис. 34. Зависимости обратных начальных скоростей окисления тиопроперазина при различных концентрациях строфантина G: 0 (1), 8,6 (2), 17,2 (3), 25,8 мкМ (4); концентрация H_2O_2 0,64 мМ; а — 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,19 нМ пероксидаза; б — 0,1 М трис-НСl буфер, pH 7, 280 нМ пероксидаза.

этом тип активирования зависел от pH, проявляясь при pH 5,0–6,0 в бесконкурентном характере (рис. 34, а), тогда как возрастание pH приводило к смене типа активирования с бесконкурентного типа на смешанный (рис. 34, б), что, возможно, связано с участием в этом процессе одной из функциональных групп активного центра фермента или белка с $pK \sim 6,0$. При pH 5,0–6,0 отмечалось наиболее эффективное связывание строфантина G в активном центре пероксидазы, что приводило к ускорению пероксидазного окисления тиопроперазина, проявляемое в бесконкурентной активации. При pH > 6,0 связывание активатора ухудшалось, однако его присутствие в активном центре улучшало последующее связывание тиопроперазина повышая эффективность каталитического превращения (табл. 10). Несколько иное действие проявлял строфантин G в реакциях пероксидазного окисления хлорпромазина, трифтазина и *о*-дианизидина.

Строфантин G ингибировал пероксидазное окисление хлорпромазина при pH 5,0–6,0, влияя как на связывание субстрата, так и на его превращение. Тогда как депротонирование функциональной группы активного центра фермента с $pK \sim 6,0$ приводило к изменению характера ингибирования со смешанного типа на конкурентный (рис. 35, а, б). При этом можно отметить, что связывание строфантина G в активном центре пероксидазы замедляло реакции пероксидазного окисления хлорпромазина, а депротонирование одной из функциональных групп активного центра фермента приводило к тому, что связывание ингибитора затрудняло последующее связывание субстрата.

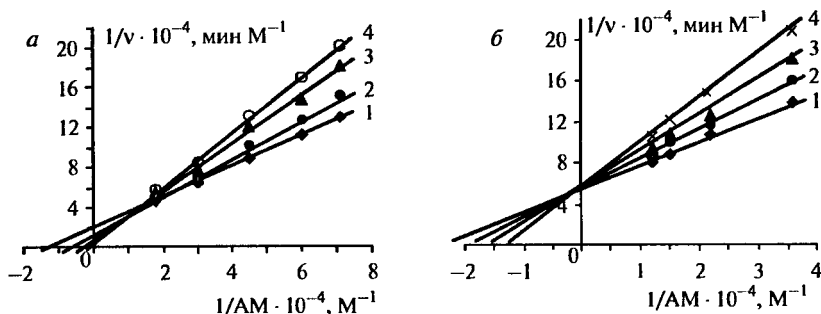


Рис. 35. Зависимости обратных начальных скоростей пероксидазного окисления аминазина при различных концентрациях строфантина G: 0 (1), 8,6 (2), 17,2 (3), 25,8 мкМ (4); концентрация H_2O_2 0,64 мМ; а — 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 5, 24 нМ пероксидаза; б — 0,1 М Tris-HCl буфер, pH 7, 47 нМ пероксидаза.

Таким образом, строфантин G и хлорпромазин при $\text{pH} > 6,0$ могут конкурировать за место связывания в активном центре фермента, при этом связывание ингибитора препятствует последующему связыванию субстрата, что и приводит к понижению скорости ферментативной реакции. Несколько иной тип ингибирования проявлял строфантин G в реакциях пероксидазного окисления трифтазина. При кислых значениях pH строфантин G связывался вблизи активного центра фермента, не влияя на связывание субстрата, что проявлялось в неконкурентном характере ингибирования (рис. 36, а). Депротонирование одной из функциональных групп активного центра пероксидазы с $\text{pK} \sim 6,0$ резко ухудшало каталитическое превращение трифтазина, пони-

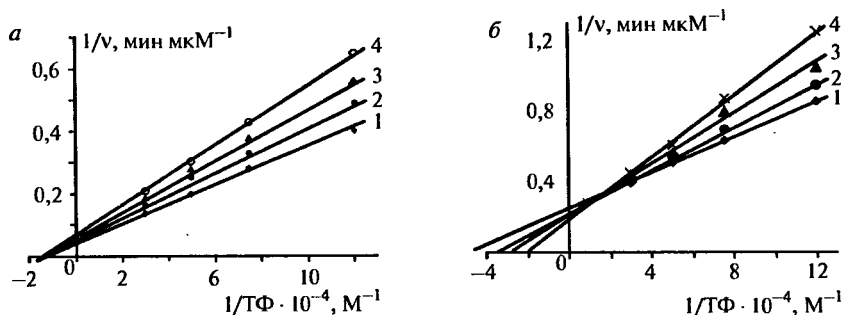


Рис. 36. Зависимости обратных начальных скоростей окисления трифтазина при различных концентрациях строфантина G: 0 (1), 8,6 (2), 17,2 (3), 25,8 мкМ (4); концентрация H_2O_2 0,64 мМ; а — 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 6, 40 нМ пероксидаза; б — 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7, 95 нМ пероксидаза.

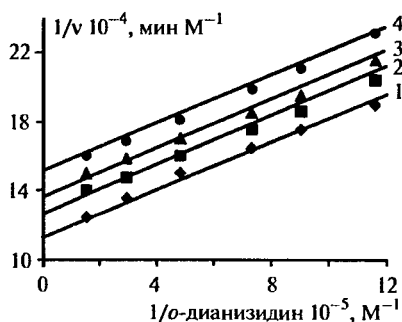


Рис. 37. Зависимости обратных начальных скоростей окисления *o*-дианизидина в присутствии различных концентраций строфантина G: 0 (1), 8,6 (2), 17,2 (3), 25,8 мкМ (4); концентрация пероксидазы 0,14 нМ; H_2O_2 — 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,5.

жая k_{cat} в 10–23 раза. Хотя при этом K_m улучшалось в 2,7–6,0 раз. По-видимому, заряд этой ионогенной группы может оказывать влияние на расположение строфантина G в активном центре фермента, что приводит к смене характера ингибирования с неконкурентного на смешанный (рис. 36, б). Показано, что строфантин G ингибирует пероксидазу в реакциях окисления *o*-дианизидина по антиконкурентному типу (рис. 37). При этом ингибитор связывался с фермент-субстратным комплексом, а не со свободным ферментом.

Связывание строфантина G в активном центре фермента в реакциях окисления фенотиазинов и *o*-дианизидина несколько различалось. При кислых значениях pH строфантин G эффективнее связывался с пероксидазой в реакциях пероксидазного окисления тиопроперазина, тогда как при окислении трифтазина, хлорпромазина и *o*-дианизидина его связывание с ферментом хуже в 2,4, 3,1 и 5,9 раз соответственно. При pH > 6,0 резко понижалась скорость каталитического процесса, при этом отмечалось улучшение в связывании эффектора в реакциях окисления хлорпромазина в 3, трифтазина — в 1,4, *o*-дианизидина — в 1,5 раза, с ухудшением связывания строфантина G при окислении тиопроперазина в 2,8 раза. В реакциях ингибирования пероксидазного окисления *o*-дианизидина строфантин G ни одна из групп активного центра фермента себя не проявила, что, возможно, объясняется различным расположением строфантина G в активном центре фермента при осуществлении реакций пероксидазного окисления фенотиазинов и *o*-дианизидина.

Исследования механизмов пероксидазного окисления фенотиазинов позволило высказать предположения о возможных сроках нахождения фенотиазинов в организме человека, а также дать предположительную оценку эффективности их действия. Среди изученных фенотиазинов выраженное седативное действие трифтазина можно объяснить за счет того, что поскольку он в присут-

ствии быстро окисляемого субстрата не окисляется пероксидазой, то он должен дольше сохранять свое функциональное действие. Быстрее всех в организме может окисляться аминазин и его действие должно быть за счет этого непродолжительным. Кроме этого обосновано действие фенотиазинов в присутствии строфантина G при их совместном использовании. Поскольку строфантин G ускоряет окисление тиопроперазина, то при их совместном введении пероксидазное окисление тиопроперазина будет возрастать, что приведет к образованию различных продуктов его окисления и к быстрой потере фармакологического действия. Тогда как пероксидазное окисление трифтазина и аминазина в присутствии строфантина G будет замедляться, обеспечивая таким образом пролонгированность действия вводимых препаратов.

3.8. УЧАСТИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПЕРОКСИДАЗНЫХ РЕАКЦИЯХ

К группе функционально активных веществ относятся производные бензола (салицилат натрия, норадреналин и викасол), участие которых в пероксидазных реакциях не исследовано. Хотя известно, что салицилат натрия и пероксидаза участвуют в повышении общей резистентности растений [Raskin, 1992]. Биосинтез салициловой кислоты осуществляется специализированной системой приобретенной устойчивости [Metraux et al, 1990, Cao et al, 1994]. В механизме индивидуальной устойчивости при инфекционном поражении растений салициловая кислота индуцирует синтез PR-белков (pathogenesis related proteins), которые могут выполнять защитную функцию как при инфекционном поражении растений, так и при стрессах различной природы [Tuan-Hua, Martin, 1980, Ильинская и др., 1991]. Так, например, в проростках пшеницы под действием салициловой кислоты происходит увеличение содержания белков с молекулярной массой от 10 до 40 кД [Вовчук и др., 1997а; 1997б]. Однако природа этих белков мало изучена. При этом известно, что при вирусной, грибковой и бактериальной инфекциях растений происходят возрастание активности пероксидазы и активация системы генерации O_2 [Doke, Ohashi, 1988], причем O_2 переводится в H_2O_2 супероксиддисмутазой [Apostol et al, 1989]. Вещества, увеличивающие суммарную активность пероксидазы, способствуют повышению

сопротивляемости растений к патогенам. Пероксидаза относится к классу окислительно-восстановительных ферментов (молекулярная масса 40 кД), способна катализировать окисление различных по строению неорганических и органических соединений. Субстратами пероксидазы могут быть функционально активные вещества: НАДН, мочева кислота, адреналин, аскорбиновая кислота, гидроксамовые кислоты, абсцизовая кислота и др. [Лебедева, Угарова, 1996]. Показано, что абсцизовая кислота может стимулировать образование изоферментов пероксидазы, при подавлении синтеза которой уменьшалось число изоферментов пероксидазы [Neuman et al, 1992].

Однако механизм индивидуального и совместного пероксидазного окисления салицилата натрия в реакциях, катализируемых пероксидазой, не изучен. Поэтому исследование участия салицилата натрия в пероксидазных реакциях позволило установить, что он является медленно окисляемым субстратом пероксидазы [Рогожин, Верхотуров, 1999а]. В реакциях совместного окисления с ферроцианидом калия связывание салицилата натрия в активном центре фермента не влияло на связывание ферроцианида калия, что проявлялось в реакции пероксидазного окисления ферроцианида в неконкурентном характере ингибирования пероксидазы (рис. 38). Однако если салицилат натрия связывался с ферментом, то дальнейшее превращение ферроцианида калия замедлялось. В реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина проявлялся смешанный тип ингибирования пероксидазы салицилатом натрия, что свидетельствует о конкуренции между *o*-дианизидином и салицилатом натрия за место связывания в активном центре фермента (рис. 39). При связывании салицилата натрия с ферментом понижалось сродство и эффективность превращения *o*-дианизидина. Выявленные механизмы ингибирования пероксидазы салицилатом натрия позволяют предположить, что участки связывания ферроцианида и *o*-дианизидина в активном центре фермента располагаются вблизи места связывания салицилата натрия. При этом особенности связывания субстратов проявлялись в индивидуальном характере ингибирования их пероксидазного окисления. Однако в процессе окисления ферроцианида и *o*-дианизидина, по-видимому, реализуются различные каналы электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы, на железо

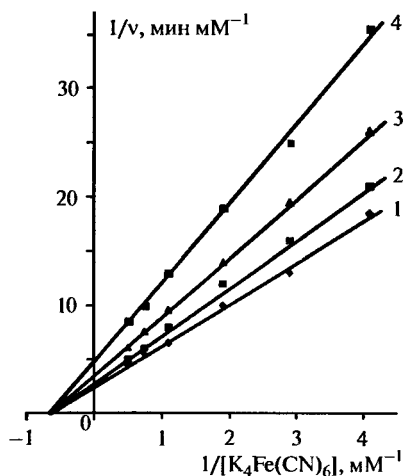


Рис. 38. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления ферроцианида калия в обратных координатах в присутствии салицилата натрия, мМ: 1-0; 2-10; 3-20; 4-40; пероксидаза — 20 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 6,0.

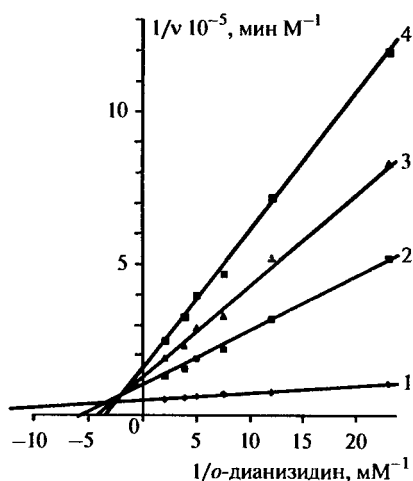


Рис. 39. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина в обратных координатах в присутствии салицилата натрия, мМ: 1-0; 2-10; 3-20; 4-40; пероксидаза — 0,4 нМ; перекись водорода — 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 4,5.

гема, что и оказывает влияние на эффективность их превращения в реакциях индивидуального и совместного окисления с салицилатом натрия.

Функционально активными веществами, выполняющими регуляторную функцию в растительных и животных тканях, являются витамины группы К и катехоламины. Действие соединений этих двух групп дополняет друг друга. Так, например, витамин К в животных и растительных тканях участвует в процессах окисления и фосфорилирования, а катехоламины стимулируют аденилатциклазу, активируют процессы фосфорилирования специализированных белков в цитоплазме, эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране, увеличивают содержание незатерифицированных жирных кислот [Уайт и др., 1981]. Хотя роль норадrenalина в метаболических процессах растительных тканей не изучена. Природные витамины группы К в зависимости от химической структуры условно делят на две группы: филлохиноны и менахиноны [Беликов, 1985]. Филлохиноны широко распространены в природе главным образом в зеленых

частях растений (листья люцерны, шпината, цветной капусте, хвое, зеленых томатах, конопле и т.д.). Менахиноны являются продуктами жизнедеятельности бактерий, в том числе содержащихся в кишечнике животных; их продуцируют различные микроорганизмы. В растениях филлохиноны участвуют в окислительно-восстановительных процессах и, в частности, окислительном фосфорилировании, а также в фотосинтетическом фосфорилировании, где служат промежуточными переносчиками электронов. Биосинтез филлохинонов идет в зеленых частях растений, однако детали этого процесса недостаточно изучены [Плешков, 1987]. В организме животных витамины группы К принимают участие в образовании протромбина и способствуют нормальному свертыванию крови. При недостатке или отсутствии в организме витамина К развиваются геморрагические явления [Машковский, 2002]. Все природные витамины группы К нерастворимы в воде. Однако синтетическим аналогом витамина К, который, сохраняя основное нафтохиноновое ядро естественного витамина, имеет менее сложное строение и вместе с тем отличается большей активностью, хорошо растворимый в воде, является викасол.

Активным гормоном мозгового слоя надпочечников служит норадреналин, который в организме животных обладает сильным сосудосуживающим действием, вызывая повышение артериального давления, стимулирует сокращения сердца, влияет на обмен углеводов [Березов, Коровкин, 1990]. Разрушение норадреналина в организме в основном принимает участие моноаминоксидаза, механизм действия которой хорошо изучен. Однако роль других окислительно-восстановительных ферментов в процессах деградации норадреналина практически не исследована. В последнее время обсуждается протекторная роль в растениях ацетилхолина, катехоламинов и серотонина в качестве стабилизаторов клеточных структур при различных неблагоприятных условиях. Биогенные амины влияют на метаболизм растительных клеток путем регуляции активности ферментов или включения в отдельные реакции в качестве субстратов. Известно, что ацетилхолин может стимулировать пероксидазную активность тканей в малых дозах, а норадреналин угнетает активность рибулезодифосфаткарбоксилазы и стимулирует фосфорилирование в хлоропластах. Норадреналин и адреналин синергически усиливали стимулированную гиббереллином элонгацию проростков [Пахомова, Чернов, 1996].

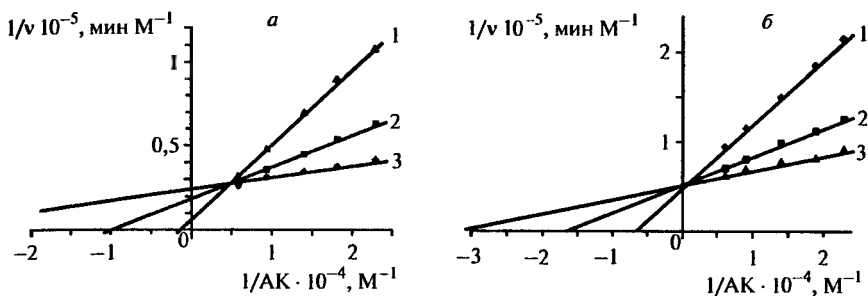


Рис. 40. Зависимость начальной скорости окисления аскорбиновой кислоты при pH 5,0 (а) и 5,5 (б) от ее концентрации при различных концентрациях норадреналина, мМ: 1-0, 2-0,24, 3-0,47. Концентрации: пероксидазы — 0,2 мкМ; перекиси водорода — 0,64 мМ; аскорбиновой кислоты — 22–176 мкМ.

Пероксидазе в растениях отводится защитная функция, регулирование которой осуществляется с помощью различных функционально активных веществ, однако механизм действия их недостаточно изучен.

Участие норадреналина и викасола в механизмах действия пероксидазы было изучено на примере реакций пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты и *o*-дианизидина [Рогожин, Верхотуров, 19986]. Показано, что в присутствии норадреналина скорость пероксидазного окисления АК возрастала, проявляясь при pH 4,5–5,0 в смешанном типе активирования (рис. 40, а). Тогда как при pH 5,5–6,5 активатор не влиял на величину k_{cat} , но уменьшал значение $K_{\text{m(каж)}}$ пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты, что соответствует синергическому типу активации (рис. 40, б), когда связывание активатора в активном центре пероксидазы увеличивает сродство фермента к субстрату и наоборот.

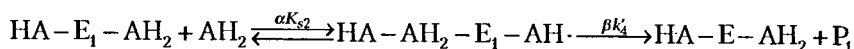
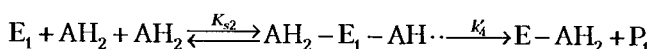
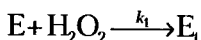
При pH < 5,5 норадреналин активировал пероксидазное окисление АК, понижая $K_{\text{m(каж)}}$ в 5–20 раз, однако при этом k_{cat} уменьшалось в 4–5 раз. При pH > 5,5 активатор не влиял на величину k_{cat} , но уменьшал $K_{\text{m(каж)}}$ в 2–5 раз. По-видимому, связывание норадреналина с активным центром пероксидазы увеличивает сродство фермента к субстрату за счет этого константа активации возрастает в 4 раза при изменении pH от 4,5 до 6,5.

Таким образом связывание норадреналина в активном центре пероксидазы увеличивает сродство фермента к субстрату при pH 4,5–6,5. При этом в реакциях активирования окисления аскорбиновой кислоты норадреналином выявляется в активном центре пероксидазы ионогенная группа с $pK_a \sim 5,5$, депротонирова-

ние которой приводило к формированию синергического типа активации. Возможно такой группой может быть имидазольная группа гистидина, определяемая в pH-зависимости констант скоростей реакций комплекса E_2 с *p*-крезолом [Ralston, Dunford, 1978] и *n*-аминобензойной кислоты [Hubbard et al, 1975]. С аналогичным pK_a выявлена ионогенная группа на pH-зависимости k_2 для NADH [Dunford, Stillman, 1976] и в реакции E_2 с *p*-аминобензойной кислотой [Угарова, Лебедева, 1978]. В комплексе пероксидазы с норадреналином, по-видимому, pK_a этой группы смещается в щелочную область и ее депротонирование происходит при более высоких значениях pH, оказывая влияние на каталитические свойства фермента.

Для объяснения кинетики активирования пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты норадреналином предложена схема 9.

схема 9



HA — норадреналин, HA — E — AN₂, HA — E₁ — AN₂, HA — AN₂ — E₁ — ANЧ — комплексы пероксидазы и ее окисленных форм с норадреналином, аскорбиновой кислотой и продуктом окисления АК.

Норадреналин ингибировал пероксидазное окисление *o*-дианизидина, проявляя при pH < 5,5 конкурентный тип ингибирования (рис. 41, а), а при pH > 5,5 — смешанный (рис. 41, б). При этом связывание норадреналина с пероксидазой ухудшало последующее связывание и окисление *o*-дианизидина, что проявлялось в возрастании значения константы ингибирования в 8 раз при изменении pH от 4,5 до 6,5. Связывание с пероксидазой норадреналина в 20—100 раз лучше, чем *o*-дианизидина, являющегося быстро окисляемым субстратом фермента. В процессе ингибирования пероксидазного окисления *o*-дианизидина норадреналином выявлялась ионогенная группа с $pK_a \sim 5,5$, депротонирование которой способствовало смене полного конкурентного типа ингибирования пероксидазы на смешанный.

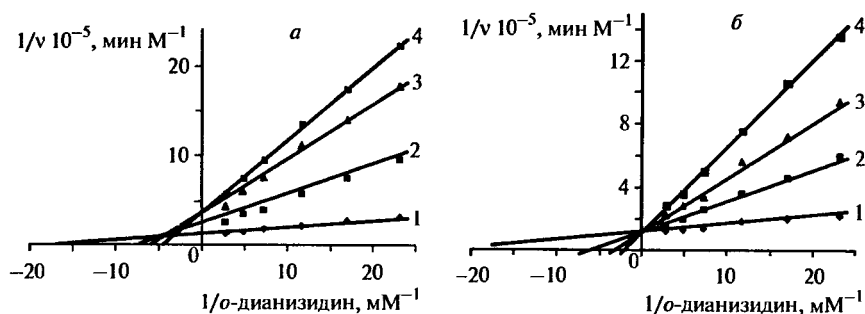
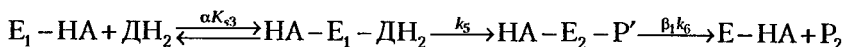
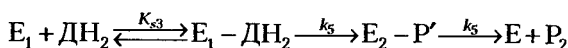
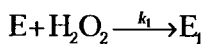


Рис. 41. Зависимость начальной скорости окисления *o*-дианизидина при pH 6,0 (а) и 4,5 (б) от его концентрации при различных концентрациях норадреналина, мкМ: 1-0, 2-3,9, 3-7,8, 4-15,6. Концентрации: пероксидазы — 0,18 нМ; перекиси водорода — 0,64 мМ; *o*-дианизидина — 43–344 мкМ.

На основании полученных данных ингибирования пероксидазного окисления *o*-дианизидина норадреналином предложена следующая схема 10.

схема 10



$E - NA$, $E_1 - NA$ — комплексы нативного фермента и E_1 с норадреналином; $NA - E_1 - DN_2$, $NA - E_2 - P'$ — тройные комплексы норадреналина, *o*-дианизидина и полуокисленного *o*-дианизидина с E_1 и E_2 соответственно.

Норадреналин не окисляется соединениями E_1 и E_2 пероксидазы, т.е. он не может быть пероксидазным субстратом фермента. Тогда как викасол восстанавливает промежуточные окисленные формы пероксидазы, являясь медленно окисляемым субстратом пероксидазы. При pH 4,5–6,0 викасол не ингибировал фермент в реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизидина и аскорбиновой кислоты, а при pH > 6,5 в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты викасол проявлял конкурентный характер ингибирования. В реакциях окисления *o*-дианизидина тип ингибирования пероксидазы викасолом зависел от pH. При pH 6,5 проявлялся конкурент-

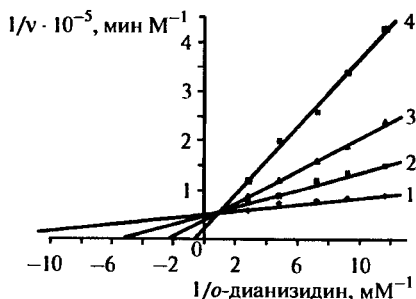


Рис. 42. Зависимость начальной скорости окисления *о*-дианизидина от его концентрации при различных концентрациях викасола, mM: 1-0, 2-0,15, 3-0,3, 4-0,6. pH 7,5. Концентрации: пероксидазы — 0,18 нМ; перекиси водорода — 0,64 мМ; *о*-дианизидина — 43–344 мкМ.

ный характер ингибирования пероксидазы, а при pH 7,0–8,0 — смешанный тип (рис. 42). Ингибирование пероксидазы викасолом в реакции окисления *о*-дианизидина менее специфично, чем норадреналином. Связывание викасола с пероксидазой в 400–1000 раз хуже по сравнению с норадреналином. Норадреналин понижает k_{cat} в реакции окисления *о*-дианизидина в 4–300 раз, а викасол — в 1,2–3,7 раза. Высокая ингибирующая способность пероксидазы, по-видимому, обусловлена наличием

NH₂-группы в молекуле норадреналина.

Ингибирующий эффект викасола, по-видимому, обусловлен тем, что он связывается в месте расположения медленно окисляемых субстратов. За счет этого викасол может конкурировать за центр связывания и влиять на окисление как быстро, так и медленно окисляемых субстратов пероксидазы. На основании полученных данных можно предположить, что пероксидаза имеет два различных участка связывания на поверхности белковой глобулы, расположенных близко друг к другу, используемых для каталитического превращения быстро и медленно окисляемых органических субстратов. При окислении в пероксидазе реализуется несколько каналов электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы, на железо гема [Угарова и др., 1981]. Доказательством этого является широкая субстратная специфичность пероксидазы.

Поскольку норадреналин проявляет нуклеофильные свойства, то он связывается в том же месте активного центра, что и *о*-дианизидин. Норадреналин изменяет pK_a функциональной группы активного центра пероксидазы в щелочную сторону, увеличивая сродство фермента к субстрату, за счет этого возрастает скорость окисления аскорбиновой кислоты. Норадреналин не окисляется соединениями E₁ и E₂ пероксидазы. При окислении *о*-дианизидина в присутствии норадреналина меж-

ду ними возникает конкуренция за центр связывания, что является причиной ингибирования пероксидазного окисления *o*-дианизидина.

3.9. ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫЕ ГРУППЫ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПЕРОКСИДАЗЫ

Химическая модификация каталитических групп ферментов позволяет установить структуру активного центра и роль отдельных функциональных групп в каталитическом процессе [Шибато, 1974]. Ранее было показано, что аминокислотные остатки лизина и поверхностные, т.е. расположенные на поверхности фермента и легко доступные модифицирующим агентам при наиболее компактной конформации его молекулы, ОН-группы тирозина, серина, треонина и углеводных остатков непосредственно не входят в активный центр пероксидазы [Кутузова, Угарова, 1981]. В то же время известно, что во взаимодействии соединения II пероксидазы (E_2) с органическими субстратами участвуют группы с pK 6,5 и 8,6 [Лебедева и др., 1977]. Можно предположить, что группа с pK 6,5 — это карбоксильная группа остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты, имеющая аномально высокое значение pK .

Молекула изофермента С пероксидазы хрена содержит 31 карбоксильные группы, включая С-концевую и две, принадлежащие пропионовым остаткам гема [Welinder, 1979]. В литературе отсутствуют данные о роли этих групп в функционировании активного центра и поддержании третичной структуры пероксидазы. Поэтому мы изучили роль доступных в обычных условиях (22 °С, pH 5,0) карбоксильных групп пероксидазы хрена в каталитическом процессе окисления органического субстрата *o*-дианизидина и неорганического — ферроцианида калия ферментом. Для этого использовали модификацию данных групп водорастворимыми карбодиимидами в присутствии и в отсутствие нуклеофильных агентов.

3.9.1. РОЛЬ ДОСТУПНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП ПЕРОКСИДАЗЫ В ПЕРОКСИДАЗНОМ КАТАЛИЗЕ

Как известно, карбодиимиды активируют карбоксильные группы так, что они приобретают способность реагировать с нуклеофилами [Hoare, Koshland, 1967]. Карбодиимиды, однако, мо-

гут сами выступать в качестве модифицирующих агентов, давая лабильные производные О-ацилмочевины, перегруппировка которых приводит к образованию устойчивых производных О-ацилмочевины [Hoare, Koshland, 1967; Timkovich, 1977]. Кроме карбоксильных групп карбодиимиды могут модифицировать в белках сульфгидрильные [Carraway, Triplett, 1970], фенольные [Carraway, Koshland, 1968] и аминогруппы (при $\text{pH} > 9,5$) [Riehm, Sheraga, 1966]. Пероксидаза не содержит сульфгидрильных групп, а из пяти ОН-групп тирозина в обычных условиях модифицируется только одна, причем активность фермента при этом не изменяется [Кутузова, Угарова, 1981].

Реакцию с карбодиимидами проводили в условиях, в которых происходит модификация главным образом карбоксильных групп фермента ($\text{pH } 5,0$; 22°C) [Hoare, Koshland, 1967]. В работе [Кутузова и др., 1983; Рогожин и др., 1983] использовали водорастворимые карбодиимиды: *n*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимида (СМЕ-карбодиимид), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDP-карбодиимид) и иодметилат *N*-*n*-фенилазофенил-*N'*-(*N,N*-диметиламинопропил) карбодиимида (PDP-карбодиимид). Последний имеет хромофорную группу, позволяющую определять число остатков, присоединенных к ферменту [Баландина и др., 1975]. В качестве нуклеофильных агентов применяли окрашенные амины: моно-динитрофенилгексаметилендиамин (DPC-диамин), моно-динитрофенилпропилендиамин (DPP-диамин), моно-динитрофенил-додекандиамин (DPD-диамин), а также пропилендиамин (Pg-диамин), гексаметилендиамин (CM-диамин) и гидроксиламин.

Спектры свободного и связанного с ферментом PDP-карбодиимида различаются (рис. 43), это свидетельствует об образовании химического соединения карбодиимида с белком. Через 1,5 ч инкубации с PDP-карбодиимидом в отсутствие аминов активность пероксидазы падает до 65%, при действии EDP-карбодиимида — до 40% и в присутствии СМЕ-карбодиимида — до 30%. Удлинение инкубации не изменяет активности фермента, хотя общее число модифицированных групп может возрастать. Таким образом, за 1,5 ч в реакцию вступают все COOH -группы, влияющие на каталитическую активность пероксидазы. Аналогичные результаты были получены при увеличении избытка PDP-карбодиимида. В этих опытах было показано, что падение активности обусловлено реакцией с

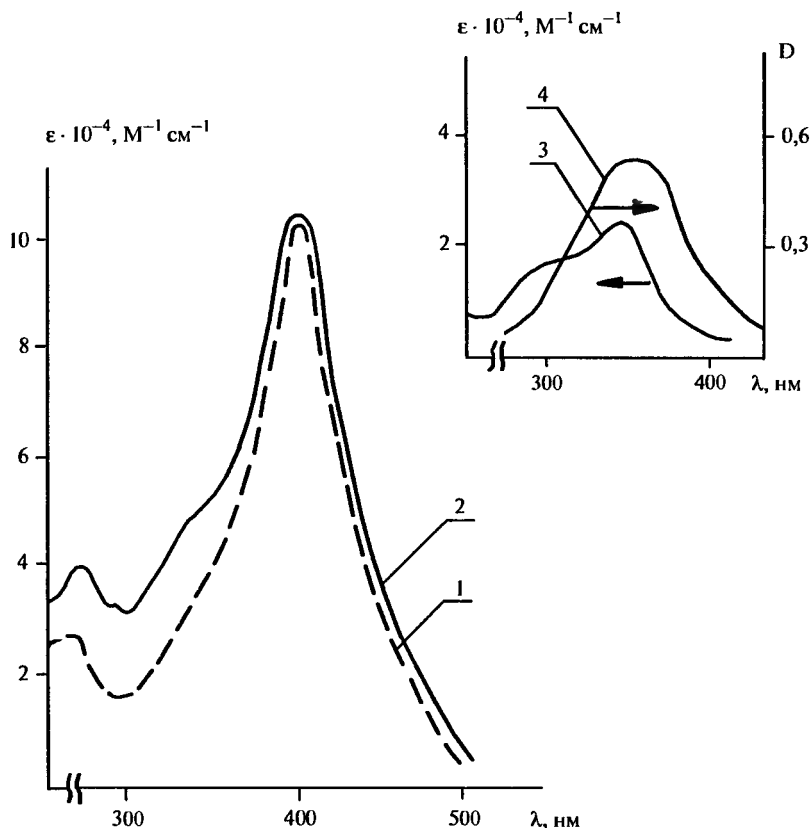


Рис. 43. Спектр поглощения пероксидазы нативной (1), модифицированной PDP-карбодиимидом (2) и PDP-карбодиимида (4): 3 — разностный спектр нативной и модифицированной пероксидазы (рН 6,0, 22 °С, 0,05 М NaCl).

карбодиимидом единственной функциональной группы фермента (рис. 44).

Полученные данные показывают, что падение активности пероксидазы обусловлено исключительно модификацией ее карбоксильных групп.

1. Поскольку спектры модифицированной и нативной пероксидазы тождественны, можно исключить денатурацию фермента.

2. Обработка модифицированной пероксидазы 1 М раствором гидроксиламина (рН 7,5; 22 °С, 22 ч), обычно используемая для регенерации модифицированных ОН-групп тирозина [Jouselle, 1977], не приводит к восстановлению активности фермента. Сле-

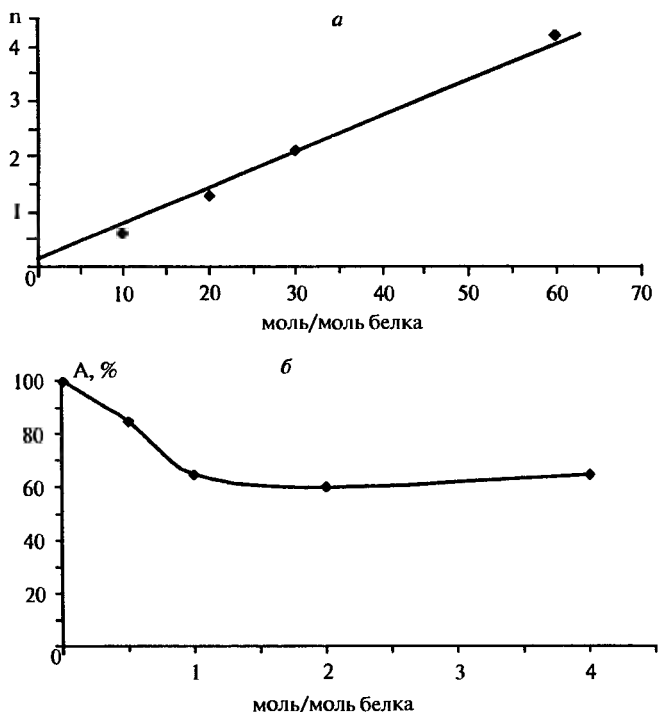


Рис. 44. Модификация пероксидазы PDP-карбодиимидом (1,5 ч): а — зависимость числа присоединенных остатков (n) от избытка реагента; б — зависимость относительной активности пероксидазы, от числа присоединенных остатков (условия определения активности на рис. 43).

довательно, падение активности пероксидазы не связано с модификацией поверхностных ОН-групп тирозина.

3. Падение активности не связано с модификацией ϵ -аминогрупп лизиновых остатков, так как ранее было показано, что модификация всех шести аминогрупп не влияет на каталитическую активность пероксидазы [Угарова и др., 1978а; 1978б]. Действительно, падение активности пероксидазы при обработке карбодиимидами не зависит от предварительного ацетилирования всех доступных аминогрупп. Этот результат одновременно показывает, что падение активности не связано с возможным образованием внутримолекулярных сшивок.

4. При действии на пероксидазу СМЕ- и EDP-карбодиимидов образуется 15–20% димеров, которые отделяли от мономеров фермента гель-хроматографией на сефадексе G-100. Актив-

ность димеров была такая же, как у мономеров, следовательно, падение активности при модификации пероксидазы не связано с образованием межмолекулярных сшивок.

Можно ожидать, что в препаратах пероксидазы, обработанных карбодиимидами в отсутствие нуклеофильных агентов, модифицированные карбоксильные группы превращены в ацилмочевинные, при этом общий положительный заряд молекулы фермента должен увеличиться. Это подтверждалось уменьшением подвижности пероксидазы, модифицированной СМЕ- и EDP-карбодиимидами, при ее хроматографии на СМ-целлюлозе (рис. 45). Активность препаратов после хроматографии не изменялась, это указывает на устойчивость производных фермента, по-видимому обусловленную перегруппировкой лабильных О-ацилмочевин в N-ацилмочевины. Согласно предположению Тимковича [Timkovich, 1977], подобная перегруппировка, а не гидролиз, характерна для тех карбоксильных групп, которые мало доступны молекулам воды после образования О-ацилмочевины, т.е. для групп, частично маскированных в глобуле.

Напротив, при хроматографии на СМ-целлюлозе пероксидазы, модифицированной PDP-карбодиимидом, элюируемый белок не содержал остатков карбодиимида и подвижность его была точно такая же, как у нативного фермента. Продукт же превращения карбодиимида элюировался с колонки только растворами высокой ионной силы и имел максимум поглощения при 335 нм (как и остатки карбодиимида в модифицированной пероксидазе). Активность пероксидазы в элюате полностью восстанавливалась, что свидетельствует о регенерации карбоксильных групп фермента.

По-видимому, О-ацилмочевинные группы, образующиеся при взаимодействии пероксидазы с PDP-карбодиимидом, не перегруппировываются в N-ацилмочевинные и подвергаются гидро-

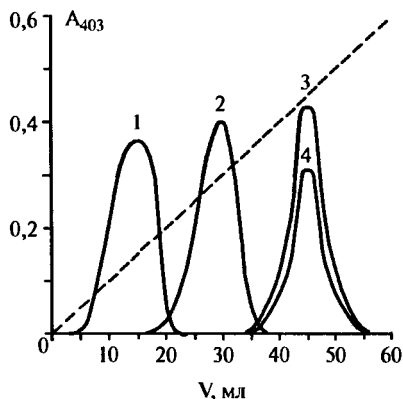


Рис. 45. Хроматография на СМ-целлюлозе пероксидазы нативной (1), модифицированной EDP-карбодиимидом (2), и EDP-карбодиимидом в присутствии Рг-диамина (3), GM-диамина (4). Пунктиром показан градиент буферного раствора.

лизу в присутствии СМ-целлюлозы. В этой связи можно отметить, что остатки PDP-карбодиимида, связанные с пероксидазой, по положению максимума полосы поглощения (335 нм) отличаются как от соответствующих модельных N-ацилмочевины, так и от пепсина, модифицированного этим карбодиимидом (325 нм [Баландина и др., 1975]).

Присутствие в среде аминов, содержащих динитрофенильную группу [Матяш и др., 1972], не сказывается на степени инактивации пероксидазы при ее обработке 0,1 М раствором EDP-карбодиимида. Связывание DPD-диамина с пероксидазой наблюдается лишь при его значительном избытке (300 моль/моль белка). После отделения реагентов гель-фильтрацией на сефадексе G-25 модифицированный препарат по спектрофотометрическим данным содержит около 1,3 динитрофенильных остатков на молекулу белка, из которых примерно половина может быть отделена последующей хроматографией на СМ-целлюлозе или же повторной гель-фильтрацией после 3-часовой инкубации в 1 М ацетатном буфере (рН 5). Таким образом, есть основания полагать, что EDP-карбодиимид наряду с ковалентным связыванием DPD-диамина вызывает и его сорбцию белком. Аналогичные результаты получены при использовании DPP-диамина и особенно DPD-диамина (табл. 11). Эффект сорбции, по-видимому, обусловлен разрыхлением белко-

Таблица 11

Взаимодействие пероксидазы (0,025 мМ) с EDP-карбодиимидом (0,1 М) и нуклеофильными реагентами, рН 5,0, 22 °С, 1,5 ч

Реагенты	Концентрация, моль/моль белка	Связывание реагента, моль/моль белка		Активность, % от исходной
		после гель-фильтрации	после хроматографии на СМ-целлюлозе	
Контроль	—	—	—	40
DPG-диамин	50	0	0	40
DPG-диамин	300	1,3	0,6	35
DPG-диамин	300	1,6	1,0	35
DPG-диамин	300	2,9	0,7	37
Pг-диамин	340	3,0	3,0	30
GM-диамин	340	2,5	2,5	40
NH ₂ OH	40000	7,0	7,0	30

вой глобулы под влиянием высокой концентрации карбодиимида и низких значений pH. В работе [Сова, Ельева, 1978], в частности, описано связывание белком DPG-диамина при инкубации в растворе детергента (бридж-35).

При использовании в качестве нуклеофильных агентов Rg- и GM-диаминов (0,1 М EDP-карбодиимида, 340 моль диамина на 1 моль белка) степень связывания этих диаминов оценивали, определяя количество аминокрупп в белке титрованием тринитробензолсульфонатом [Угарова и др., 1978а; 1978б]. В случае Rg-диамина пероксидазная активность уменьшилась на 70%, причем фермент содержал 3 моль диамина на 1 моль белка. Несколько меньшие потеря активности и связывание диамина наблюдались при применении GM-диамина (табл. 11). Модифицированный фермент по своим спектральным характеристикам не отличался от нативного.

Присутствие в среде диаминов не сказывается на количестве димеров фермента, образующихся при действии на пероксидазу EDP-карбодиимида (15–20%). В то же время связывание диаминов заметно уменьшает подвижность модифицированного белка при его хроматографии на CM-целлюлозе (рис. 45). Естественно предположить, что в данных опытах диамины подвергались только моноацилированию, т.е. не образовывали меж- или внутри-белковых сшивок.

При действии на пероксидазу EDP-карбодиимида в присутствии гидроксиламина, по-видимому, происходит перегруппировка Лоссеня [Hoare, Koshland, 1966], поскольку в модифицированном ферменте обнаруживается больше аминокрупп, чем в нативном. По данным титрования тринитробензолсульфонатом, в аминокруппы превращаются семь COOH-групп на молекулу белка. В спектре модифицированного фермента уширяются полосы поглощения гема, так что он становится похож на спектр денатурированной пероксидазы. Вероятно, сильное увеличение положительного заряда молекулы пероксидазы приближает ее конформацию к структуре денатурированного белка. Активность такого препарата составляет 30% от исходной, т.е. примерно такая же, как у пероксидазы, модифицированной EDP-карбодиимидом в отсутствие гидроксиламина (табл. 11).

Каталитические свойства пероксидазы, модифицированной карбодиимидами, были изучены в реакциях окисления *o*-дианизидина, ферроцианида калия и их смеси. При окислении *o*-диа-

низицина перекисью водорода рН-зависимости k_{cat} и K_m ($3,5 < \text{pH} < 9$) одинаковы у исходных и модифицированных препаратов. Следовательно, модифицируемые карбоксильные группы не ответственны за уменьшение активности, наблюдаемое при увеличении рН. Данные (рис. 46) показывают, что модификация карбоксильных групп карбодиимидами приводит к резкому уменьшению k_{cat} , при незначительном изменении K_m .

Влияние модификации карбоксильных групп фермента на кинетику окисления перекисью водорода неорганического субстрата — ферроцианида калия — мы изучили на примере пероксидазы, обработанной EDP-карбодиимидом. Значения k_{cat} и K_m после модификации практически не изменяются в диапазоне рН 4,0—8,0 и совпадают с данными для нативной пероксидазы, которые приведены в работе [Лебедева и др., 1981]. Таким образом, модификация карбодиимидами карбоксильных групп пероксидазы не сказывается на окислении ферроцианида.

Изучение кинетики окисления смеси двух субстратов, *о*-дианизида и ферроцианида калия при рН 4,0—8,0 дало возможность

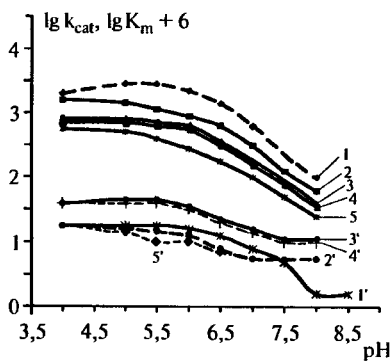


Рис. 46. рН-зависимости каталитических констант k_{cat} (1–5) и K_m (1'–5') окисления *о*-дианизида в присутствии пероксидазы нативной (1, 1'), модифицированной PDP — (2, 2') EDP (3, 3'), СМЕ-карбодиимидами (5, 5'), а также EDP-карбодиимидами в присутствии DPG-диамина (4, 4'). 0,01 М буфер (рН 3,7–5,5 — Na-ацетатный, рН 6–8 — Na-фосфатный) 0,1 М KNO_3 , 0,65 мМ H_2O_2 , 0,2–0,4 нМ пероксидаза, 5–170 мкМ *о*-дианизиндин.

определить константы индивидуальных стадий окисления *о*-дианизида (рис. 47) (метод предложен в [Лебедева и др., 1981]). После обработки пероксидазы EDP-карбодиимидом в оптимуме каталитической активности при рН 5 в 8 раз уменьшается k_3 , т.е. константа скорости переноса первого электрона с *о*-дианизида на E_1 и примерно в 2 раза — k_4 , т.е. константа скорости окисления *о*-дианизида промежуточной формой пероксидазы E_2 (табл. 12). В то же время в 2 раза уменьшается $K_s = k_{-2}/k_2$, т.е. улучшается связывание *о*-дианизида с E_1 . Ранее было найдено, что при пероксидазном окислении *о*-дианизида $k_3 = 10 \cdot k_4$ и поэтому $k_{cat} = k_4$. Иными словами, лимитирующей стадии

ей здесь является окисление *о*-дианизидина промежуточной формой пероксидазы E_2 [Лебедева и др., 1977; Лебедева и др., 1981]. В случае пероксидазы, обработанной EDP-карбодиимидом, значения k_3 и k_4 оказываются сравнимыми по величине (табл. 12) и, следовательно, для модифицированного фермента в отличие от нативного экспериментально определяемая величина k_{cat} является функцией констант k_3 и k_4 . Таким образом, константы скорости окисления *о*-дианизидина формами E_1 и E_2 после модификации карбоксильных групп не только уменьшаются, но и становятся сравнимыми по величине.

В отдельных опытах было показано, что присутствие в среде аминов, диаминов и гидроксиламина при обработке пероксидазы EDP-карбодиимидом не сказывается на значениях k_{cat} и K_m , свойственных ферменту, модифицированному одним EDP-карбодиимидом. Таким образом, эти кинетические характеристики изменяются непосредственно в результате взаимодействия пероксидазы с карбодиимидом.

Полученные данные показывают, что лишь несколько из 31 имеющихся в пероксидазе карбоксильных групп доступны модифицирующим агентам. Остальные находятся, вероятно, внутри глобулы.

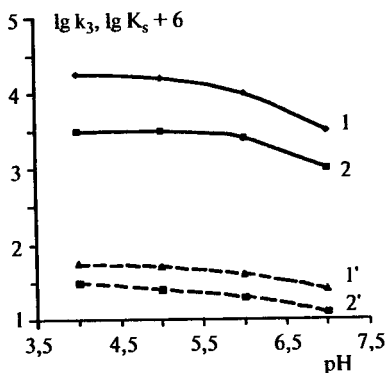


Рис. 47. pH-зависимости величин $\lg k_3$ (1, 2) и $\lg K_s + 6$ (1', 2') для индивидуального окисления *о*-дианизидина, найденных из данных о совместном окислении перекисью водорода ферроцианида калия и *о*-дианизидина для нативной (1, 1') и модифицированной PDP-карбодиимидом (2, 2'). Условия те же, что на рис. 46; концентрация ферроцианида калия — 0,1 мМ.

Таблица 12

Кинетические параметры реакции пероксидазного окисления *о*-дианизидина. Рассчитаны из данных об окислении смеси *о*-дианизидина и ферроцианида калия; условия см. подпись к рис. 47; pH 5,0

Препарат	$k_3, 10^{-3}, c^{-1}$	$k_4, 10^{-3}, c^{-1}$	$K_4, 10^5, M$
Нативная пероксидаза	20	2,9	5,5
Пероксидаза, модифицированная EDP-карбодиимидом	2,5	1,7	2,6

Изучение каталитических свойств пероксидазы, обработанной карбодиимидами, показало, что модифицируемые ими частично маскированные карбоксильные группы располагаются вблизи участка активного центра фермента, ответственного за связывание органического субстрата (*o*-дианизидина). Объемистые ацилмочевинные остатки экранируют активный центр; следствием этого является уменьшение констант скоростей переноса электрона с донора водорода — *o*-дианизидина — на окисленные формы пероксидазы E_1 и E_2 . В то же время усиливается связывание *o*-дианизидина с ферментом. Неорганические субстраты связываются в другом участке активного центра пероксидазы, что и проявляется в особенностях механизма их окисления. Возможно поэтому модификация карбоксильных групп, функционально важных для окисления *o*-дианизидина, не влияет на окисление ферроцианида калия. Дополнительная модификация трех — семи экспонированных в раствор карбоксильных групп пероксидазы нуклеофильными агентами не влияет на каталитические свойства фермента.

3.9.2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА ДОСТУПНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ С ПОМОЩЬЮ *o*-ДИАНИЗИДИНА И ВОДОРАСТВОРИМОГО КАРБОДИИМИДА

Метод количественного определения степени модификации карбоксильных групп в белках, предложенный Кошландом [Hoage, Koshland, 1967; Carraway, Koshland, 1972], основан на активации COOH -групп водорастворимым карбодиимидом с последующим замещением карбодиимида нуклеофилом — метиловым эфиром глицина. Число модифицированных групп определяется либо с помощью аминокислотного анализа, что весьма трудоемко и не позволяет детектировать малые степени модификации, либо методом меченых атомов, что требует использования реагентов, содержащих радиоактивные изотопы. Ранее был предложен ряд методов спектрофотометрического определения модифицированных карбоксильных групп с помощью карбодиимидов или нуклеофилов, содержащих хромофорные заместители [Баландина и др., 1975; Матяш и др., 1972]. Однако эти реагенты имеют ряд существенных недостатков. Окрашенный нуклеофил — динитрофенилгексаметилендиамин (DPG-диамин) мало реакционноспособен и, кроме того, сильно сорбируется на белке [Угарова и др., 1982].

Его полоса поглощения (360 нм) перекрывается с полосой Соре в гемовых белках, что затрудняет количественное определение числа присоединившихся остатков DPG-диамина и спектрофотометрическое определение концентрации модифицированного гембелка. Водорастворимый карбодиимид, содержащий хромофорную группу (иодметилат-N-*n*-фенилазофенил-N'-(N,N'-диметиламинопропил) карбодиимид) нередко образует с белками неустойчивые соединения, которые разрушаются при хроматографической очистке модифицированного белка [Угарова и др., 1982].

Для определения числа доступных в данных условиях карбоксильных групп в белках в известной реакции их с водорастворимым карбодиимидом мы предлагаем использовать в качестве нуклеофильного агента *o*-дианизидин (3,3-диметоксибензидин). Этот реагент содержит две аминогруппы с pK 3,6 и 4,7 [Moller, Ottolenghi, 1966], имеет максимум поглощения при 300 нм ($\epsilon = 16,5 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ в 0,05 М NaCl), не поглощает в видимой области (рис. 48) и, как будет показано ниже, высокореакционноспособен. Его особенно целесообразно использовать для исследования гемсодержащих белков и ферментов у которых в спектрах при 300–320 нм наблюдается минимум поглощения, что дает возможность с большей точностью определять степень модификации СООН-групп белка, чем при использовании нуклеофилов, поглощающих в области полосы Соре. Например, для пероксидазы хрена минимум поглощения в УФ области спектра наблюдается при 315 нм ($\epsilon = 15 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$, см. рис. 48, *a*). При использовании же в качестве нуклеофила DPG-диамина измерение поглощения проводят при 360 нм ($\epsilon = 15 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), где пероксидаза имеет $\epsilon = 45 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Нами разработан метод спектрофотометрического определения числа доступных карбоксильных групп в белках с использованием *o*-дианизидина и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDP-карбодиимид) и с помощью этого метода выявлено число доступных и функционально важных карбоксильных групп в пероксидазе хрена.

Перспективность использования *o*-дианизидина в качестве высокореакционного нуклеофила для определения доступных СООН-групп в белках наглядно видно на примере модификации пероксидазы хрена. Пероксидазу модифицировали по методу Кошланда [Hoare, Koshland, 1967], используя 0,01 и 0,1 М EDP-карбодиимид и 0,43 мМ *o*-дианизидин.

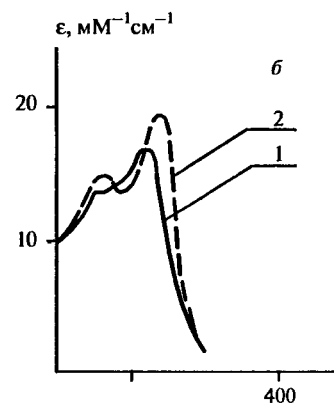
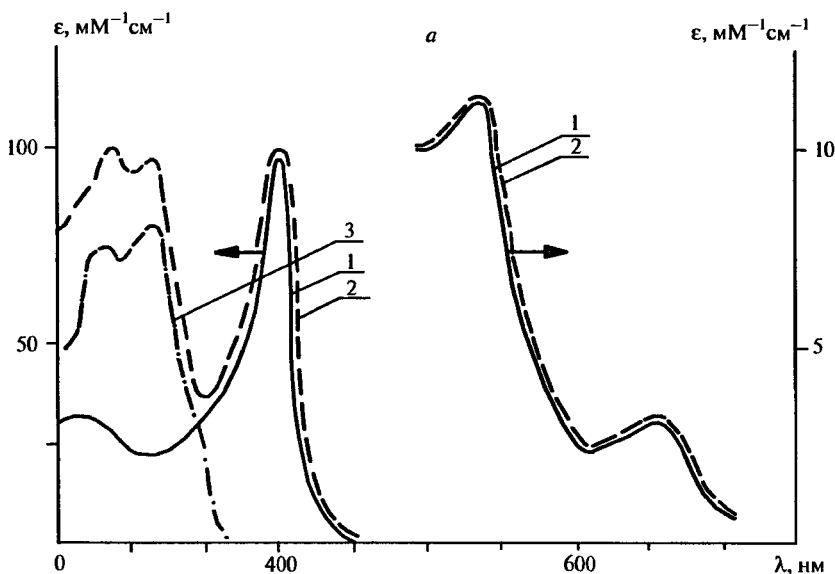


Рис. 48. *a* — спектры поглощения нативной (1) и модифицированной (4 COOH-группы) *o*-дианизидином (2) пероксидазы, их разностный спектр (3); *б* — спектры *o*-дианизидина в растворе (1) и *o*-дианизидина, связанного с белком (2). Условия: 22 °C, 0,05 M NaCl.



Растворимость *o*-дианизидина в воде мала [Moller, Ottolenghi, 1966], поэтому исходный раствор его (4,3 мМ) готовили в абсолютном этиловом спирте в результате чего реакционная смесь при модификации содержала примерно 10% спирта.

Для модифицированной EDP-карбодиимидом и *o*-дианизидином пероксидазы увеличивается поглощение в УФ-области и не наблюдается изменений в поглощении ни в области полосы Core, ни в видимой области. Спектр пероксидазы, модифицированной только EDP — карбодиимидом, тождественен спектру нативной пероксидазы. Разностный спектр модифицированного и нативного

фермента свидетельствует о том, что остатки *о*-дианизидина, ковалентно связанные с белком, имеют максимум поглощения при 305 нм, а не при 300 нм, как исходный *о*-дианизидин в растворе (рис. 48, б). Модельное соединение — N-ацетил-*о*-дианизидин — имеет спектр поглощения той же формы, что и *о*-дианизидин, ковалентно связанный с белком. Молярный коэффициент поглощения модельного соединения, который принимали за молярный коэффициент поглощения остатков *о*-дианизидина, ковалентно связанных с белком, при 305 нм составляет $19,0 \text{ mM}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (рис. 48, б).

Модифицированный фермент не содержит примеси нативного белка, как показано хроматографией на СМ-целлюлозе при рН 5,0 и 4,0 в градиенте Na-ацетатного буфера (0,005–1,5 М). Из-за увеличения общего положительного заряда молекулы модифицированная пероксидаза элюируется при большей ионной силе, чем нативная и тем позже, чем выше степень модификации карбоксильных групп (рис. 49). Ранее мы показали, что при модификации пероксидазы DPG-диамином и карбодиимидом основная часть DPG-диамина связывается с пероксидазой нековалентно и отделяется от белка при хроматографии на СМ-целлюлозе [Угарова и др., 1982]. В данном случае число остатков *о*-дианизидина, связанных с белком, после хроматографии не изменяется, что свидетельствует об отсутствии неспецифической сорбции *о*-дианизидина на белке. Методом гель-хроматографии на сефадексе G-100 мы показали, что модифицированная *о*-дианизидином и EDP-карбодиимидом пероксидаза не содержит межмолекулярных сшивок, в то время как при использовании в качестве нуклеофилов других диаминов образовывалось до 20% димеров фермента.

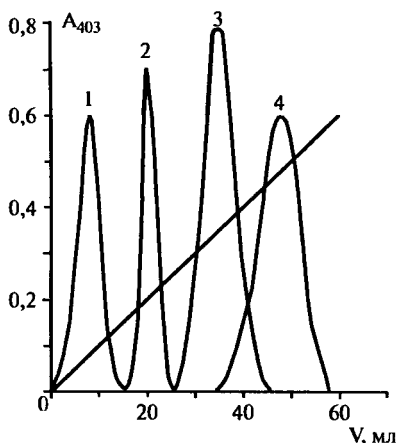


Рис. 49. Хроматография на СМ-целлюлозе нативной и модифицированной 0,01 М EDP-карбодиимидом пероксидазы (1), пероксидазы, модифицированной в течение 1,5 ч 0,1 М EDP-карбодиимидом (2), и пероксидазы, модифицированной EDP-карбодиимидом в присутствии *о*-дианизидина (3, 4); 3 — модифицировано 4 COOH-группы, 4 — модифицировано 7 COOH-групп. Прямой линией показан градиент буферного раствора.

Следует отметить ряд других преимуществ *o*-дианизидина как нуклеофила в реакциях модификации СООН-групп белков при участии карбодиимида.

1. *o*-Дианизидин обладает гораздо большей реакционной способностью, чем другие, обычно используемые нуклеофилы — амины и диамины, поскольку, как было показано нами, при концентрациях, в десятки раз меньших (и прочих равных условиях), модифицирует в пероксидазе большее число карбоксильных групп. Таким образом, используя малые (0,4–0,6 мМ) концентрации *o*-дианизидина, можно осуществить модификацию всех доступных СООН-групп в компактной нативной конформации белковой глобулы, в то время как при обычно используемых концентрациях нуклеофилов (до 1 М) нативная структура белка может быть нарушена.

2. Максимум поглощения *o*-дианизидина, ковалентно связанного с белками, лежит в области минимального поглощения гем-содержащих белков, что уменьшает ошибку при расчете малых степеней модификации СООН-групп. Кроме того, для гемопротеинов молярный коэффициент поглощения в области полосы Соре после присоединения *o*-дианизидина не изменяется. Это позволяет определять концентрацию модифицированного белка, как и нативного, спектрофотометрически по поглощению в области полосы Соре.

На примере трипсина мы показали, что *o*-дианизидин удобно использовать также для модификации СООН-групп в других, не содержащих гем белках, поскольку их поглощение при 305 нм не превышает 15%-ного поглощения при 280 нм.

3. С помощью двойной модификации: сначала используя нуклеофил, не несущий хромофорной группы, а затем проводя модификацию повторно в присутствии *o*-дианизидина, можно определять число модифицированных первым нуклеофилом СООН-групп белка, в частности, можно определить число СООН-групп, модифицирующихся одним карбодиимидом.

Применение *o*-дианизидина может быть ограничено лишь тем, что из-за его малой растворимости в воде реакционная среда должна содержать около 10% спирта. Однако, несмотря на это, все сказанное выше показывает преимущества и перспективность использования *o*-дианизидина как нуклеофила по сравнению с другими обычно используемыми нуклеофилами для быстрого определения количества доступных СООН-групп в

белках и для изучения их расположения в молекуле при различных условиях.

Известно, что при активации карбоксильных групп карбодиимидами образуются неустойчивые промежуточные производные О-ацилизомочевины [Hoare, Koshland, 1967]. В отсутствие нуклеофила эти производные либо гидролизуются водой (если СООН-группы полностью экспонированы в растворитель), либо перегруппировываются в устойчивые производные N-ацилмочевины (III) если они маскированы для растворителя и нуклеофила [Timkovich, 1977].

В присутствии нуклеофила активированные СООН-группы, экспонированные в растворитель, либо гидролизуются, либо ковалентно присоединяют молекулу нуклеофила, а активированные СООН-группы, которые маскированы для растворителя и нуклеофила, претерпевают перегруппировку в N-ацилмочевину, причем последний процесс протекает во много раз медленнее, чем реакции с нуклеофилом [Hoare, Koshland, 1967]. Таким образом, в зависимости от расположения в глобуле и условий модификации карбоксильные группы белка либо совсем не модифицируются, если находятся вдали от поверхности молекулы и стерически недоступны, либо могут модифицироваться только карбодиимидом, либо только нуклеофилом, либо и тем и другим. Мы смогли дифференцировать модифицируемые СООН-группы пероксидазы по их расположению в глобуле фермента, проводя модификацию EDP-карбодиимидом в отсутствие и в присутствии о-дианизидина.

При реакции пероксидазы с EDP-карбодиимидом в отсутствие о-дианизидина о степени модификации СООН-групп EDP-карбодиимидом можно судить по изменению подвижности модифицированного фермента при хроматографии на СМ-целлюлозе. Пероксидаза, обработанная 0,01 М EDP-карбодиимидом при рН 5,0 в течение 1,5 ч, хроматографируется подобно нативному ферменту (рис. 49, кривая 1). Однако объем элюции пероксидазы, модифицированной 0,1 М EDP-карбодиимидом в тех же условиях, больше, чем нативной (рис. 49, кривая 2).

Следовательно, при 0,01 М концентрации EDP-карбодиимида и рН 5,0 за 1,5 ч не происходит модификации СООН-групп пероксидазы с образованием устойчивых производных N-ацилмочевины. 0,1 М EDP-карбодиимид в тех же условиях модифицирует некоторое количество СООН-групп пероксидазы.

Таблица 13

Зависимость числа присоединившихся к пероксидазе остатков *о*-дианизидина и активности модифицированной пероксидазы от концентрации модифицирующих агентов. Условия реакции модификации: 22 °С, 1,5 ч, pH 5,0, концентрация пероксидазы 0,025 мМ

Концентрация модифицирующих агентов		Число присоеди- ненных остатков <i>о</i> -дианизидина	Активность, % от нативного фермента
EDP-карбодиимида, М	<i>о</i> -дианизидина, мМ		
0,01	—	—	100
0,1	—	—	45
0,01	0,65	3	30
0,1	0,43	4	20
0,1	—	—	45
0,1	—	—	—
0,1	—	2	20
0,1	0,43	—	—

Изучена зависимость числа присоединяемых молекул *о*-дианизидина от концентрации EDP-карбодиимида (табл. 13), времени модификации и pH среды при постоянной концентрации пероксидазы и *о*-дианизидина (соотношение *о*-дианизидин/пероксидаза = 17,2). При pH 5,0 и 0,01 М EDP-карбодиимиде (соотношение EDP-карбодиимид/пероксидаза = 400) модификация протекает медленно и не заканчи-

вается даже за 4 ч. При этом к ферменту присоединяется до трех остатков *о*-дианизидина (рис. 50, кривая 1). В присутствии 0,1 М EDP-карбодиимида (соотношение EDP-карбодиимид/пероксидаза = 4000) уже за 1,5 ч достигается максимальная степень модификации *о*-дианизидином (четыре COOH-группы), и далее число модифицированных COOH-групп не увеличивается (рис. 50, кривая 2).

При использовании 0,1 М EDP-карбодиимида в 1,5 раза большей концентрации *о*-дианизидина и прочих равных условиях в фермен-

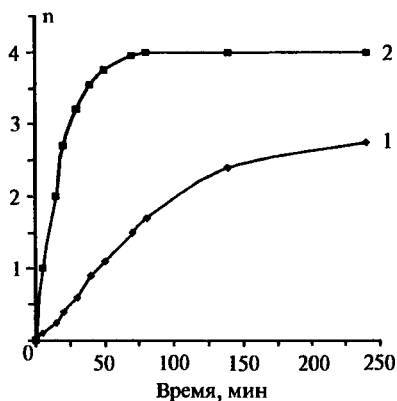


Рис. 50. Зависимость числа присоединенных к пероксидазе молекул *о*-дианизидина (*n*) от длительности модификации. Условия модификации: 22 °С, pH 5,0. Концентрации: пероксидаза — 25 мкМ; *о*-дианизидин — 0,43 мМ; EDP-карбодиимид — 0,01 (1), 0,1 (2).

те также модифицируются только четыре COOH -группы. Следовательно, при pH 5,0 и 22 °C конформация молекулы пероксидазы такова, что экспонированными и доступными модифицирующим агентам являются лишь четыре (из 31) COOH -группы фермента. Остальные COOH -группы, вероятно, маскированы и недоступны в этих условиях модифицирующему агенту.

При pH 4,0 и 0,1 М EDP-карбодиимиде 0,43 мМ *o*-дианизидин в пероксидазе максимально модифицирует семь COOH -групп. Различие в степени модификации фермента при pH 5,0 и 4,0 объясняется, по-видимому, тем, что при уменьшении pH происходит некоторое «разрыхление» белковой глобулы пероксидазы, в результате чего доступность COOH -групп возрастает.

Таким образом, благодаря высокой реакционной способности *o*-дианизидина мы смогли изучить кинетику реакции модификации и определить максимальное число доступных COOH -групп в пероксидазе при pH 5,0 и 4,0.

Количество COOH -групп пероксидазы, которые модифицируются EDP-карбодиимидом в отсутствие нуклеофила, мы определили методом повторной модификации. Сначала фермент инкубировали 1,5 ч с 0,1 М EDP-карбодиимидом при pH 5,0 в отсутствие *o*-дианизидина, отделяли избыток реагента, затем проводили повторную модификацию, используя 0,1 М EDP-карбодиимид и 0,43 мМ *o*-дианизидин. При этом *o*-дианизидин модифицировал не четыре, а лишь две COOH -группы (табл. 13). Следовательно, в отсутствие *o*-дианизидина EDP-карбодиимид модифицирует две частично маскированные для растворителя COOH -группы с образованием *N*-ацилмочевины. Две карбоксильные группы, которые модифицируются только *o*-дианизидином, по-видимому, более экспонированы в растворитель, чем две другие COOH -группы, которые модифицируются как карбодиимидом, так и нуклеофилом в присутствии карбодиимида.

Следовательно, четыре максимально доступные модификации *o*-дианизидином при pH 5,0 карбоксильные группы пероксидазы мы смогли отнести к двум типам: две COOH -группы полностью экспонированы в растворитель и две частично маскированы.

Используя 0,01 М EDP-карбодиимид и варьируя длительность реакции модификации и концентрации *o*-дианизидина, мы получили препараты модифицированного фермента, содержащие различное число присоединенных остатков *o*-дианизидина. Фракции с одинаковой степенью модификации выделя-

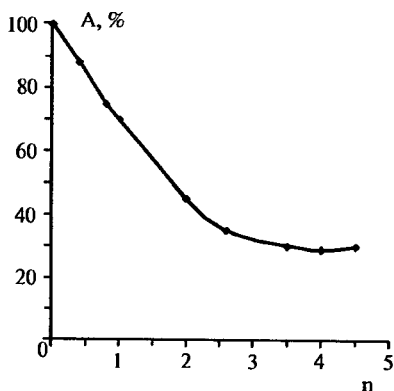


Рис. 51. Зависимость относительной активности пероксидазы от числа присоединенных остатков *o*-дианизидина (n).

ли хроматографически на СМ-целлюлозе. Мы показали, что препараты с одинаковым числом модифицированных СООН-групп имели одну и ту же активность независимо от того, достигали мы необходимую степень модификации варьированием концентрации *o*-дианизидина или длительности реакции. Причем, как было показано выше, в этом случае не происходит модификация СООН-групп пероксидазы EDP-карбодиимидом с образованием N-ацилмочевины.

Зависимость активности пероксидазы от степени модификации СООН-групп *o*-дианизидином в присутствии 0,01 М EDP-карбодиимида показана на рис. 51. При увеличении числа модифицированных групп до трех активность фермента падает до 30% и далее не уменьшается, хотя число модифицированных СООН-групп может быть увеличено до четырех. Эти три СООН-группы функционально не совсем равноценны: модификация первой снижает активность пероксидазы на 30%, а каждой следующей — на 20%. Возможно, СООН-группа, модифицирующаяся *o*-дианизидином первой, и есть та единственная группа, модификация которой карбодиимидом, содержащим хромофорную группу, уменьшает на 35% активность пероксидазы.

Используя 0,1 М EDP-карбодиимид и *o*-дианизидин, мы также получили фермент с тремя модифицированными *o*-дианизидином группами, однако активность его составляла лишь 20% от нативной. Время удерживания модифицированного таким образом фермента на колонке с СМ-целлюлозой также значительно увеличивалось. Следовательно, в этом случае происходит модификация дополнительных СООН-групп пероксидазы EDP-карбодиимидом с образованием N-ацилмочевины, что несколько уменьшает каталитическую активность фермента.

Обработка пероксидазы 0,1 М EDP-карбодиимидом снижает ее активность до 45% от нативной. Повторная обработка карбодиимидом не изменяет активности фермента (табл. 13). Как было показа-

но выше, при этом карбодиимидом модифицируются две из трех функционально важных СООН-групп пероксидазы. Последующая модификация данного препарата *o*-дианизидином уменьшает активность фермента до 20% за счет модификации еще одной функционально важной СООН-группы, так же как и в случае, когда первоначально для модификации используют 0,1 М EDP-карбодиимид и *o*-дианизидин. Таким образом, из четырех доступных при pH 5,0 СООН-групп пероксидазы функционально важными для процесса окисления *o*-дианизидина являются три группы.

pH-Зависимости каталитических констант окисления *o*-дианизидина из реакции совместного пероксидазного окисления *o*-дианизидина и ферроцианида калия были получены для пероксидазы с тремя модифицированными *o*-дианизидином СООН-группами (рис. 52). Константы индивидуальных стадий пероксидазного окисления *o*-дианизидина (k_3 и k_4), характеризующие скорости переноса электронов с субстрата на промежуточные формы E_1 и E_2 пероксидазы, а также константа связывания субстрата *o*-дианизидина формой E_1 пероксидазы (K_s) были определены как описано ранее [Лебедева, 1981]. Модификация трех функционально важных СООН-групп пероксидазы уменьшает значения k_3 и k_4 (k_3 примерно в 10 раз, а k_4 в 1,5 раза) во всем диапазоне pH, при этом связывание субстрата несколько улучшается (K_s уменьшается в 1,5 раза) и в меньшей степени зависит от pH, чем для нативной пероксидазы. В то же время каталитические параметры реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия для пероксидазы с тремя модифицированными СООН-группами не отличаются от параметров для нативного фермента так же, как и в работе [Угарова и др., 1982].

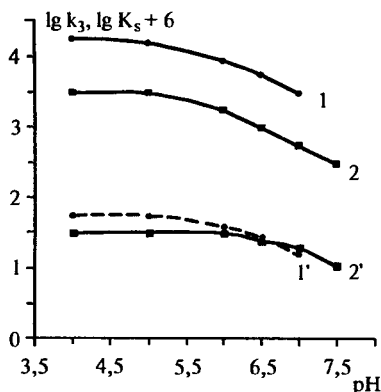


Рис. 52. Зависимости каталитических констант k_3 (1, 2) и K_s (1', 2') окисления *o*-дианизидина перекисью водорода для нативной (1, 1') и модифицированной (2, 2') *o*-дианизидином (3 СООН-групп) пероксидазы, полученные при совместном окислении *o*-дианизидина и ферроцианида калия. Условия: 22 °С, 0,01 М буфер (pH 4,0–5,5 — Na-ацетатный, pH 6,0–8,0 — Na-фосфатный), 0,1 М KNO_3 . Концентрации: пероксидаза — 0,1–0,4 нМ; $K_4[Fe(CN)_6]$ — 0,1 мМ; *o*-дианизидин — 7,8–172 мкМ; H_2O_2 — 0,7 мМ.

Таким образом, из четырех доступных модификации СООН-групп фермента три группы, хотя и в не совсем равной степени, функционально важны для пероксидазного окисления *o*-дианизидина — донора водорода, но не участвуют в окислении донора электрона — ферроцианида калия. Одна из трех групп полностью экспонирована в раствор и модифицируется только нуклеофилом — *o*-дианизидином. Две другие несколько маскированы для растворителя и могут быть модифицированы как нуклеофилом, так и карбодиимидом с образованием устойчивых производных *N*-ацилмочевины (в отсутствие нуклеофила).

После модификации трех функционально важных СООН-групп пероксидазы остаточная активность составляет 30% активности нативного фермента. По-видимому, эти группы расположены вблизи участка связывания *o*-дианизидина и важны для процесса переноса электронов с органического субстрата — донора водорода — на промежуточные формы E_1 и E_2 пероксидазы. В результате модификации *o*-дианизидином изменяется заряд, увеличивается объем и гидрофобность СООН-групп, поэтому уменьшение констант k_3 и k_4 может быть обусловлено также затруднением диссоциации и выхода продукта в раствор. В то же время связывание органического субстрата, *o*-дианизидина с ферментом по этим же причинам может облегчаться. На пероксидазное окисление субстратов, связывающихся в других участках активного центра пероксидазы, модификация СООН-групп фермента не оказывает влияние.

Таким образом, на основании проведенных исследований химической модификации пероксидазы можно высказать предположение, что в активном центре пероксидазы имеется несколько участков связывания субстратов. Поэтому поверхностными и доступными модификации являются лишь те боковые функциональные группы белка, которые входят в участок активного центра фермента, предназначенного для связывания *o*-дианизидина. Основная часть функциональных групп пероксидазы, в том числе и группы, входящие в состав других участков активного центра, маскированы либо располагаются внутри белковой глобулы, либо защищены углеводными остатками и поэтому недоступны модифицирующим агентам. Такая структурная организация пероксидазы обусловлена особенностями механизма действия этого фермента, т.е. необходимостью защищать каталитически важные функцио-

нальные группы от действия свободных радикалов — промежуточных продуктов пероксидазного окисления субстратов, которые могут инактивировать фермент.

3.9.3. РОЛЬ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП ГЕМИНА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ

Пероксидаза относится к группе сложных белков, состоящих из апобелка и гемина. Гемин нековалентно связан с белком за счет гидрофобных и ионных связей. Один из пропионовокислых остатков гемина образует ионную связь с одной из аминогрупп белка. Причем нарушение этой связи приводит к понижению активности пероксидазы [Савицкий, 1979].

Ранее было высказано предположение о наличии остатка Asp-43 в дистальной области активного центра пероксидазы [Araiso, Dunford, 1979] и показано, что пропионовокислые остатки гемина важны для его правильной ориентации на белке [DiNello, Dolphin, 1981], но непосредственно не участвуют в образовании соединения E_1 пероксидазы с H_2O_2 [Araiso, Dunford, 1981]. Однако оставался неясным вопрос об эквивалентности по своим структурно-организационным и функциональным свойствам $COOH$ -группы гемина в положении 6 и 7 и участвуют ли они в образовании соединения E_2 и в его взаимодействии с субстратами-восстановителями. Поэтому мы изучили роль карбоксильных групп гемина в катализе пероксидазы. Для этого из модифицированной *o*-дианизидином пероксидазы был выделен гемин (*m*-гемин) и изучены его некоторые свойства. В ИК-спектрах *m*-гемина проявлялось уменьшение пика при 1720 см^{-1} ($COOH$ -группа) и появлялся пик при 1650 см^{-1} (амидная группа); изменялись также величины R_f . Однако скорость рекомбинации нативного апобелка с *m*-геминном, выход реконструированного фермента и его активность по *o*-дианизидину мало отличались от аналогичных характеристик пероксидазы, полученной при рекомбинации нативного белка и нативного гемина (табл. 14). Анализ спектров поглощения реконструированной из нативного апобелка и *m*-гемина пероксидазы показал, что фермент содержит один остаток *o*-дианизидина. Следовательно, при модификации *o*-дианизидином $COOH$ -групп пероксидазы модифицируется также один пропионовокислый остаток гемина. Полученные данные по модификации гемина в пероксидазе явно показывают неэкви-

Таблица 14

Свойства гемина, выделенного из нативной и модифицированной *o*-дианизидином пероксидазы, и свойства пероксидазы, реконструированной из нативного апофермента и различных препаратов гемина

Пероксидаза, из которой выделен гемин, используемый для реконструкции	Активность* исходных препаратов пероксидазы, %	Величины R_f ** гемина	Выход реконструированной пероксидазы, % от апобелка	Активность реконструированной пероксидазы*, %
Нативная	100	0,53	93	100***
Модифицированная <i>o</i> -дианизидином (4 COOH-группы)	30	0,85	82	75

* — Условия определения активности те же, что на рис. 52.

** — Величины R_f определены методом тонкослойной хроматографии в системе гексан-хлороформ-этанол (1:1:1).

*** — Активность пероксидазы, реконструированной из нативного кофермента и нативного гемина, принимали за 100%.

валентность пропионовокислых остатков гемина в положении 6 и 7, что проявлялось при связывании гемина со специфическим апоферментом. Один пропионовокислый остаток гемина в пероксидазе расположен вблизи поверхности молекулы фермента и модифицируется *o*-дианизидином. Этот остаток не участвует ни в связывании гемина с белком, ни в пероксидазном окислении субстратов. Второй остаток маскирован внутри глобулы и недоступен модификации при pH 5,0. Именно этот остаток образует внутримолекулярную связь с белком, и его модификацией объясняется отмеченное в работе [Araiso, Dunford, 1981] значительное снижение скорости рекомбинации гемина с апопероксидазой, уменьшение выхода и активности реконструированного фермента при использовании для рекомбинации модифицированных гемин.

Таким образом, на основании данных по химической модификации нативной пероксидазы и исследований реконструированной пероксидазы можно предположить, что гемин фермента погружен глубоко во внутрь белковой глобулы. При этом его винильные группы направлены в глубь белка, а остатки пропионовых кислот в положениях 6 и 7 ориентированы наружу. Поэтому доступной для модифицирующих соединений является только одна из COOH-групп гема, тогда как вторая погружена во внутрь глобулы и недоступна модифицирующим агентам.

3.9.4. ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ N-ЭТИЛАМИДОМ О-СУЛЬФОБЕНЗОИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

С целью определения локализации модифицированной карбодиимидом карбоксильной группы пероксидазы, мы применили метод ингибиторного анализа с использованием сходного по строению с субстратом (*о*-дианизидином) ингибитора, который не участвует в окислительно-восстановительных реакциях пероксидазы, но может конкурировать за центр связывания с одним из ее субстратов [Рогожин и др., 2000б]. Это позволило исследовать субстрат связывающую площадку активного центра фермента, а также оценить степень доступности карбоксильных групп после модификации и каталитические характеристики нативной и модифицированной *п*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимидом пероксидазы. В качестве ингибитора использовали N-этиламид *о*-сульфобензоилуксусной кислоты (амид III).

Известно, что изучение влияние ингибиторов на каталитическую активность ферментов является одним из методов, позволяющих исследовать их механизм действия. Ингибиторный метод был использован и ранее для исследования механизма пероксидазного окисления неорганических и органических соединений, катализируемого пероксидазой [Pettigrew et al., 1976]. Ингибиторы пероксидазы могут различными путями влиять на катализируемый ферментом окислительный процесс. Ионы цианида, фторида и азида подавляют каталитическую активность пероксидазы за счет образования прочных комплексов по шестому координационному положению железа гема, предотвращая реакцию с перекисью водорода. Ряд органических соединений ингибируют пероксидазу, реагируя с ее промежуточными E_1 и E_2 соединениями. Некоторые из них, такие как аскорбиновая кислота, НАДН [Лебедева, Угарова, 1997], сахара [Saunders et. al., 1964], тиомочевина [Pettigrew et al., 1976], относятся к медленно окисляемым субстратам пероксидазы, ингибирующий эффект которых в реакции окисления *о*-дианизидина достигается за счет их прочного связывания в активном центре фермента. Некоторые вещества, реагируя с пероксидазой, инактивируют фермент. Так, необратимое инактивирующее действие фенилгидразина связано с модификацией функциональных групп пероксидазы (предположительно остатка триптофана) свободнорадикальными продуктами его некаталитического и каталитического окис-

ления, образующимися при инкубировании с пероксидазой [Лебедева, 1980]. Это приводило к изменению конформации активного центра фермента, частичному экспонированию гема в раствор и последующей его деструкции. Тиомочевина является не только конкурентным обратимым ингибитором пероксидазного окисления *o*-дианизидина, но способна модифицировать фермент, что приводит к его инактивации. Для однозначной интерпретации результатов, полученных при изучении влияния амида III на каталитические свойства пероксидазы, прежде всего было выяснено, не связано ли изменение каталитической активности фермента с побочными действиями ингибитора: 1) инактивацией и модификацией пероксидазы амидом III; 2) реакцией ингибитора с субстратами пероксидазы — перекисью водорода и *o*-дианизидином — в ходе каталитического процесса. Добавление амида III снижало активность фермента, однако последующее инкубирование фермента в присутствии ингибитора не приводило к дальнейшему изменению активности пероксидазы. Присутствие в среде субстрата пероксидазы — *o*-дианизидина несколько уменьшало влияние амида III на активность фермента. Специальными экспериментами было показано, что исследуемый амид III не реагирует ни с перекисью водорода, ни с *o*-дианизидином (исследовались спектр поглощения амида III в присутствии H_2O_2 и изменение концентрации H_2O_2 при ее инкубировании с амидом III при концентрациях амида III 0,05 М и H_2O_2 8 мМ). Активность пероксидазы определяли по *o*-дианизидину, используя H_2O_2 в концентрации в 4 раза меньшей насыщающей. Установлено, что ни спектр амида III, ни концентрация H_2O_2 в инкубируемой смеси не изменялись в течении часа. Кроме того, при инкубировании *o*-дианизидина в присутствии 0,16 мМ H_2O_2 и 10 мМ амида III, не происходило окисление *o*-дианизидина в отсутствие пероксидазы, т.е. не наблюдалось увеличения скорости фоновой реакции, которая составляла в данном случае менее 3%. Следовательно, изменение активности пероксидазы в присутствии амида III можно объяснить его ингибирующим влиянием на фермент, но не инактивацией фермента. Обратимость ингибирующего действия амида III на пероксидазу проводили методом разбавления. При разбавлении смеси пероксидаза — амид III в 10 раз при pH 5,0, активность фермента понижалась в 8 раз, а при pH 7,5 — только в 5 раз. Следовательно, процесс взаимодействия пероксидазы с амидом III обратим и зависит от pH.

Кинетика пероксидазного окисления *о*-дианизидина нативной и модифицированной СМЕ-карбодиимидом пероксидазы как в присутствии, так в отсутствие амида III подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен (рис. 53). Точка пересечения пучка прямых лежит в правом верхнем квадранте, что свидетельствует о сложном механизме влияния амида на нативную пероксидазу. Действительно, с ростом концентрации амида увеличивается как V_m , так и K_m фермента, однако отношение степеней их изменения меньше 1, поэтому можно рассматривать амид как ингибитор нативной пероксидазы.

Из экспериментальных данных, представленных как зависимость кинетических констант от концентрации амида в координатах

$$\frac{1}{V_{m(\text{каж})}/V_m - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{\alpha K_i}{\beta - 1} \times \frac{1}{[I]}$$

$$\frac{1}{K_{m(\text{каж})}/K_m - 1} = \frac{1}{\alpha - 1} + \frac{\alpha K_i}{\alpha - 1} \times \frac{1}{[I]}$$

определяли величины α и β (рис. 54). Зависимости ингибирования пероксидазного окисления *о*-дианизидина под действием амида были аналогичны в диапазоне pH 5,0–7,5. При увеличении pH от 5 до 7,5 величина α возрастает в 4 раза, а β — в 1,5 раза (табл. 15). Константу инги-

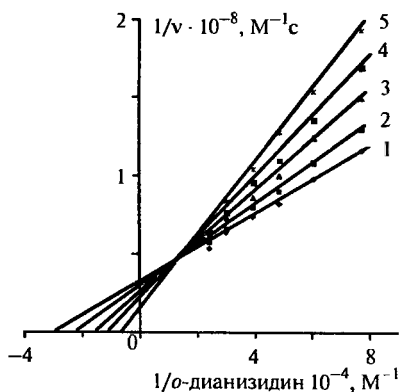


Рис. 53. Зависимость начальной скорости окисления нативной пероксидазой *о*-дианизидина от его концентрации в присутствии амида III. Концентрации: пероксидаза — 0,04 нМ; *о*-дианизидин — 0,012–0,18 мМ; перекись водорода — 0,64 мМ; амид III — 1–0; 2–10; 3–20; 4–40; 5–60 мкМ; 0,01 М натрий-фосфат, 0,1 М KNO₃, pH 6,0.

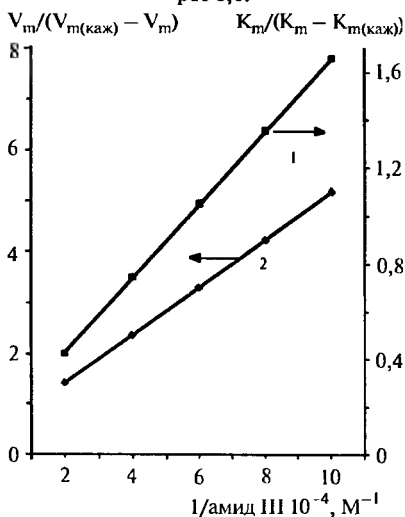


Рис. 54. Определение постоянных α (1) и β (2) для процесса ингибирования пероксидазы в присутствии амида III при окислении *о*-дианизидина. Условия те же, что на рис. 53.

Таблица 15

Константы Михаэлиса и константы α и β для ингибирования амидом III реакции окисления *o*-дианизидина, катализируемой нативной и модифицированной карбодиимидом пероксидазой при различных pH

pH	Пероксидаза							
	нативная		модифицированная		нативная		модифицированная	
	K_m , мкМ	K_i , мкМ	K_m , мкМ	K_i , мкМ	α	β	α	β
5,0	33 ± 3	250 ± 15	50 ± 5	79 ± 6	4,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2	20 ± 2	6 ± 1
5,5	32 ± 3	130 ± 12	н.о.	н.о.	7,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	н.о.	н.о.
6,0	42 ± 4	94 ± 5	35 ± 2	42 ± 3	7,7 ± 0,2	2,4 ± 0,2	н.о.	н.о.
7,0	26 ± 2	62 ± 5	н.о.	н.о.	8,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2	н.о.	н.о.
7,5	15 ± 2	34 ± 2	19 ± 2	24 ± 2	17,7 ± 0,4	2,2 ± 0,2	н.о.	н.о.

н.о. — не определяли.

бирования (K_i) рассчитывали методом Диксона [Березин, Клевсов, 1976].

При pH 5,0 амид III ингибировал пероксидазу, модифицированную СМЕ-карбодиимидом, по тому же механизму, что и нативный фермент (точка пересечения в правом верхнем квадранте). При pH > 5,5 наблюдался конкурентный тип ингибирования модифицированной пероксидазы (рис. 55).

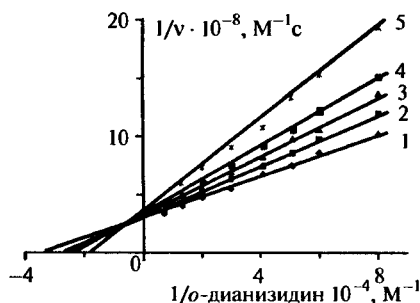


Рис. 55. Зависимость начальной скорости окисления *o*-дианизидина пероксидазой, модифицированной СМЕ-карбодиимидом, от его концентрации в присутствии амида III. Концентрации: модифицированная пероксидаза — 0,2 нМ; *o*-дианизидин — 12–180 мкМ; перекись водорода — 0,64 мМ; амид III — 1-0; 2-10; 3-20; 4-40; 5-800 мкМ; 0,1 М натрий-фосфат, 0,1 М KNO₃, pH 6,0.

Изучение pH-зависимости константы ингибирования амидом III нативной пероксидазы показало, что на величину K_i влияет ионизация группы с pK 6,0, депротонирование которой улучшает связывание амида III с пероксидазой (рис. 56), причем в диапазоне pH 5,0–7,5 константа ингибирования изменяется почти в 10 раз (табл. 15).

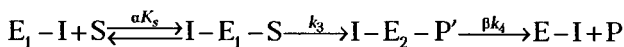
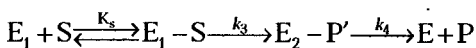
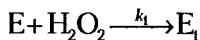
Для пероксидазы модифицированной СМЕ-карбодиимидом в том же диапазоне pH K_i изменяется в 3 раза и при этом не проявляется влияние группы с pK 6,0 (рис. 56).

Необычный тип ингибирования амидом III нативной пероксидазы показывает, что ингибитор влияет как на связывание субстрата, так и на процесс его превращения.

Ингибирование нативной пероксидазы амидом III можно описать схемой 11 [Лебедева и др., 1977].

Пероксидаза, модифицированная СМЕ-карбодиимидом, образует с амидом III фермент-ингибиторный комплекс $[mE_1 - I]$, не способный связывать окисляемый субстрат (конкурентное ингибирование). Наблюдаемый тип ингибирования нативной пероксидазы амидом, по-видимому, можно объяснить наличием обширной субстрат-связывающей площадки в активном центре фермента, где могут разместиться и ингибитор (амид III) и субстрат (*o*-дианизидин), а также влиянием амида III на процесс пероксидазного окисления *o*-дианизидина, причем связывание одного из них затрудняет последующее связывание другого, т.к. величина α увеличивается от 4,3 при pH 5,0 до 17,7 при pH 7,5, при этом значения K_m и K_i становятся соизмеримы (табл. 15). В то же время скорость окисления *o*-дианизидина в комплексе пероксидаза-амид III возрастает (постоянная β увеличивается в 2 раза) (табл. 15).

схема 11



E , E_1 и E_2 — нативная пероксидаза и ее окисленные формы; S и I — *o*-дианизидин и амид III; $E_1 - S$, $E_2 - P'$, $E_1 - I$, $I - E_1 - S$, $I - E_2 - P'$ — комплексы окисленных форм пероксидазы с *o*-дианизидином в отсутствие и присутствии амида III.

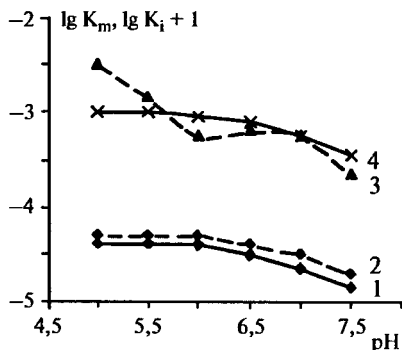


Рис. 56. pH-зависимости констант Михаэлиса (1, 2) и констант ингибирования амидом III (3, 4) пероксидазного окисления *o*-дианизидина в присутствии нативной (2, 3) и модифицированной СМЕ-карбодиимидом (1, 4) пероксидазы.

Полное конкурентное ингибирование пероксидазы, модифицированной СМЕ-карбодиимидом, объясняется, по-видимому, введением в область активного центра фермента остатка карбодиимида, что создает пространственные затруднения для связывания *o*-дианизидина с комплексом пероксидаза-ингибитор. Изменения профиля рН-зависимости K_i для модифицированной пероксидазы при $pH < 6,0$ может быть обусловлено изменением заряда в области активного центра пероксидазы вследствие модификации карбодиимидом карбоксильных групп, расположенных вблизи активного центра фермента.

Таким образом, в области активного центра нативной пероксидазы имеется протяженная субстратсвязывающая площадка, представленная несколькими участками индивидуального связывания субстратов, что создает условие для одновременного связывания ингибитора и субстрата. Причем, связывание одного из них затрудняет последующее связывание другого. В то же время в комплексе фермент-ингибитор-субстрат процесс превращения субстрата несколько ускоряется ($\beta > 1$). В модифицированной пероксидазе, в области субстрат-связывающей площадки (участке связывания *o*-дианизидина), по-видимому, находится по крайней мере один остаток карбодиимида в результате чего возникают стерические затруднения для одновременной посадки ингибитора и субстрата. Однако их индивидуальное связывание модифицированной пероксидазой несколько улучшается. Полученные данные показывают, что по крайней мере одна из модифицируемых $COOH$ -группа пероксидазы располагается в области активного центра фермента в участке связывания *o*-дианизидина. Модификация этой группы оказывает влияние на процесс связывания *o*-дианизидина. Причем, только используя ингибитор (амид III), удалось уточнить локализацию данной $COOH$ -группы в активном центре пероксидазы, т.к. характер связывания ингибитора с нативной и модифицированной СМЕ-карбодиимидом пероксидазой резко различались.

3.10. МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДЫ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ

Пероксидаза катализирует оксидазные и пероксидазные реакции окисления различных органических соединений. Активность фермента регулируется самими субстратами, проявляющи-

ми взаимное влияние при протекании каталитического процесса. Тогда как стабильность фермента обуславливается присутствием в среде белков и кальция.

В работах [Угарова и др., 1978б; Кутузова, Угарова, 1981] показано, что стабильность пероксидазы может зависеть как от числа модифицированных групп апобелка, так и от природы модифицирующего агента и от присутствия ионов Ca^{2+} . Установлено, что стабильность ацетилированной пероксидазы в 11 раз выше, чем нативной, а добавки ионов Ca^{2+} приводят к дополнительной стабилизации фермента. Причем отмечена аддитивность стабилизирующих воздействий ионов Ca^{2+} и ацетилирования. При модификации большого количества функциональных групп апобелка, например, модификация 6-ти аминогрупп с помощью ТНБС приводит к дестабилизации пероксидазы [Угарова и др., 1978а; 1978б].

Однако в литературе приводятся противоречивые данные относительно стабилизирующего влияния углеводов на пероксидазу. В ряде случаев влияние их на стабильность фермента было исключено. Хотя углеводы являются составной частью фермента и способны выполнять ряд функций. В составе фермента углеводы представлены нейтральными и аминасахарами в количестве до 20% от общего веса [Shannon et al., 1966]. Разнообразие углеводов пероксидазы показывает их состав: галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, ксилоза, фруктоза гексозамин [Klapper, Hackett, 1965]. Все аминокислотные последовательности, выходящие на поверхность белковой глобулы фермента, имеющие состав Asn-X-Ser(Thr), являются гликозилированными (за исключением остатков 286-288) [Аммосова и др., 1997]. Молекула пероксидазы содержит восемь олигосахаридных цепочек. Центрами гликозилирования являются аминокислотные остатки с номерами 13-15, 57-59, 158-160, 186-188, 198-200, 214-216, 255-257 и 268-270 [Упоров, Егоров, 1997].

Основной функцией углеводов, входящих в состав пероксидазы является: а) защищать фермент от инактивирующего действия свободных радикалов, образующихся при протекании оксидазных и пероксидазных реакций [Угарова и др., 1981]; б) обеспечивать растворимость фермента в полярных растворителях; в) обуславливать взаимодействие фермента с мембранами и за счет этого встраивать фермент в определенные участки мембран органелл и клетки [Левашов, 1987]; г) защищать фермент от инактивирующего действия высоких температур и растворителей [Клячко и др., 1997].

3.10.1. ВЛИЯНИЕ МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕРОКСИДАЗЫ

Для выяснения регуляторной роли углеводов в механизме действия пероксидазы нами было исследовано влияние углеводов на каталитические свойства фермента и на его термостабильность. В качестве представителей моно- и олигосахаридов были выбраны следующие соединения: глюкоза, маннит, мальтоза, лактоза, сахароза.

Исследуя влияние моно- и олигосахаридов на каталитические свойства пероксидазы, было показано, что кинетика пероксидазного окисления *o*-дианизидина как в присутствии, так и в отсутствие углеводов подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Зависимости начальной скорости окисления *o*-дианизидина от его концентрации при pH 5,0 и 7,0 в присутствии всех выбранных нами моно- и олигосахаридов в координатах Лайнуивера-Берка имели вид семейства прямых, пересекающихся на оси ординат, что указывает на конкурентный характер ингибирования (рис. 57). Причем для большинства углеводов значения констант ингибирования (K_i) при pH 5,0 было в 1,5–1,8 раз выше, чем при pH 7,0

(табл. 16). Это свидетельствует о том, что в кислых pH связывание углеводов хуже, по сравнению с щелочными pH. Аналогичная зависимость отмечается и для многих субстратов пероксидазы, в частности, *o*-дианизидина [Лебедева и др., 1977]. Однако величины констант ингибирования значительно выше, чем значения констант связывания, определяемые для субстратов пероксидазы. Эта разница может достигать нескольких порядков, указывая на то, что углеводы хотя и могут являться субстратами пероксидазы, однако основным их предназначением, по-видимому, является участие в регулировании механизма действия фермента. Особенно это может проявлять-

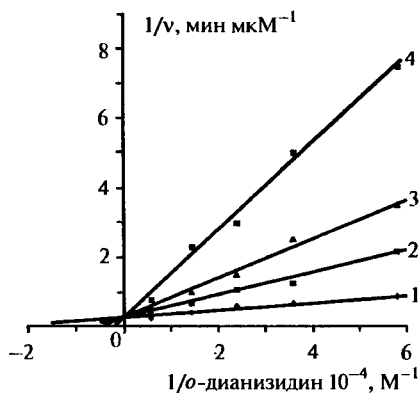


Рис. 57. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления *o*-дианизидина от его концентрации в координатах Лайнуивера-Берка в присутствии сахарозы. Концентрации: пероксидаза — 0,081 нМ; *o*-дианизидин — 17,2–172 мкМ; перекись водорода — 0,64 мМ; сахароза — 1-0; 2-0,29; 3-0,58; 4-0,88 М; 0,01 М натрий-фосфат, pH 5,0.

Таблица 16

**Величины констант ингибирования моно- и олигосахаридов пероксидазы
в реакциях окисления *o*-дианизидина**

Углевод	pH	K_i , mM
Глюкоза	5,0	184 ± 15
	7,0	106 ± 10
Маннит	5,0	365 ± 20
	7,0	315 ± 24
Мальтоза	5,0	25 ± 2
	7,0	17 ± 1
Лактоза	5,0	128 ± 11
	7,0	93 ± 5
Сахароза	5,0	309 ± 22
	7,0	225 ± 15

ся в растениях при завершении их роста растяжением, когда усиливается лигнизация клеточных стенок и накапливаются ингибиторы фенольной природы, способствующие возрастанию активности пероксидазы в тканях [Grierson, Covey, 1984].

3.10.2. ВЛИЯНИЕ МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

Стабилизирующее влияние ионов Ca^{2+} на пероксидазу можно объяснить образованием прочных хелатов с карбоксильными и карбонильными группами, расположенными на поверхности белковой глобулы фермента [Кутузова, Угарова, 1981].

Тогда как в случае модификации пероксидазы карбодиимидами и нуклеофилами могут модифицироваться только те карбоксильные группы фермента, которые расположены близко к поверхности и не участвуют в стабилизации пероксидазы. При этом ионы Ca^{2+} образуют хелаты с несколькими маскированными карбоксильными группами, которые вследствие стерических затруднений не могут быть промодифицированы ни карбодиимидами, ни нуклеофилами [Рогожин, 1984].

Для понимания роли углеводов в биокатализе, процессах сворачивании белков, обладающих каталитическим действием, исследуются ферменты не содержащие углеводные фрагменты [Lehninger et al., 1993]. При этом используются методики создания искусственно гликозилированного аналога негликозилированного фермента [Hughes, 1983]. Пероксидаза позволяет облегчить эту задачу, поскольку относится к группе природных

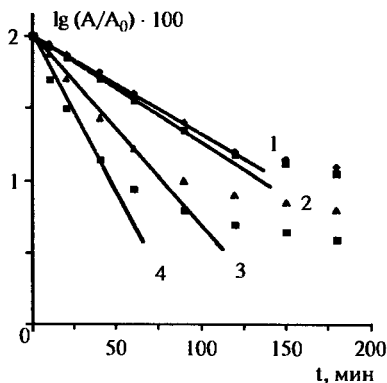


Рис. 58. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых термоинактивации пероксидазы в присутствии глюкозы при 60 °С. Концентрации: пероксидаза — 0,1 мкМ; глюкоза — 0 (1), 0,011 (2), 0,055 (3), 1,11 М (4); 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0.

гликозилированных ферментов [Угарова и др., 1981]. Поэтому исследование негликозилированной рекомбинантной формы пероксидазы в системе обращенных мицелл АОТ, содержащего в своем составе углеводный фрагмент, позволило установить наличие существенной стабилизации у рекомбинантной пероксидазы, которая приближалась к стабильности природной пероксидазы. В отсутствие углевода рекомбинантная пероксидаза была крайне нестабильна [Клячко и др., 1997]. Причем во всем диапазоне степеней гидротации ПАВ рекомбинантная пероксидаза была менее стабильна при инкубации в системе обращенных мицелл, чем

природная пероксидаза. При этом высказывалось предположение, что только благодаря «углеводной шубе» на поверхности белковой глобулы природной пероксидазы достигается высокая стабильность фермента [Клячко и др., 1997].

Для проверки высказанного предположения нами было изучено влияние глюкозы, маннита, мальтозы, лактозы и сахарозы на термостабильность фермента. При этом кинетика термоинактивации пероксидазы как в отсутствие, так и в присутствии углеводов следовала первому порядку до 50%-ной глубины инактивации при температуре 60 °С (рис. 58). Увеличение концентрации углевода приводило к возрастанию $k_{ин}$. Следовательно, увеличение концентрации углевода в среде приводит к нарушению нативной конформации фермента. Пероксидаза является одним из наиболее термостабильных ферментов, однако повышение содержания моно- и олигосахаридов в инкубационной среде во всех случаях оказывало дестабилизирующий эффект на фермент, который зависел от природы и концентрации углевода (табл. 17). Наибольшее понижение стабильности фермента отмечалось при внесении в инкубационную среду мальтозы и лактозы в присутствии которых термостабильность фермента при 60 °С понижалась в 2,1–2,7 раза (табл. 17).

Таблица 17

Константы скорости необратимой термоинактивации ($k_{ин}$) пероксидазы в присутствии моно- и олигосахаридов. Условия: 60 °С, 0,1 мкМ пероксидаза; 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0

Углевод	Концентрация углевода, М (%)	$k_{ин}$, 10' мин ⁻¹	$k_{ин}/k'_{ин}$
Контроль	—	6,7	—
Глюкоза	0,011 (0,2)	6,7	1,00
	0,055 (1,0)	12,3	1,80
	1,11 (20,0)	21,0	3,10
Маннит	0,33 (6,0)	10,5	1,60
	0,49 (9,0)	9,1	1,40
	0,66 (12,0)	8,5	1,30
Лактоза	0,0058 (0,2)	8,2	1,20
	0,029 (1,0)	11,7	1,70
	0,58 (20,0)	18,2	2,70
Сахароза	0,29 (10,0)	7,3	1,10
	0,58 (20,0)	8,5	1,30
	0,87 (30,0)	5,1	0,76
Мальтоза	0,035 (1,2)	5,5	0,82
	0,07 (2,4)	6,5	0,97
	0,175 (6,0)	7,0	1,04
	0,29 (10,0)	14,2	2,10
	0,58 (20,0)	18,4	2,70

Таким образом, проведенными экспериментами было установлено, что присутствие пероксидазы в среде с высоким содержанием углеводов понижает как активность, так и термостабильность фермента. Проявляемый эффект может являться составной частью регуляторного механизма, основанного на том, что углеводы, расположенные на поверхности глобулы фермента, проявляют стабилизирующий эффект, тогда как углеводы среды могут оказывать как ингибирующее, так и дестабилизирующее действие.

3.11. ДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПЕРОКСИДАЗЫ

Исследование кинетики пероксидазных реакций позволило установить, что неспецифическое связывание субстратов различной природы может происходить в протяженной субстратсвязи-

вающей области активного центра пероксидазы, расположенной на поверхности белковой глобулы фермента, в составе доменов которой присутствуют преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки. Непосредственно в активном центре пероксидазы не проявляются аминокислотные остатки, содержащие SH-, OH-, NH₂- и COOH-группы.

Большие размеры субстратсвязывающей области позволяют связываться в активном центре пероксидазы неорганическим и органическим соединениям, что проявляется в неизбирательности действия фермента по отношению к природе окисляемого субстрата в реакциях индивидуального окисления, на протекание которых могут оказывать влияние присутствующие в среде активаторы или ингибиторы фермента. Так, например, изучение пероксидазных реакций окисления *o*-дианизидина и гидрохинона в присутствии индолил-3-уксусной кислоты позволило установить индивидуальные участки связывания этих субстратов и ингибитора в активном центре пероксидазы, поскольку место связывания ИУК на поверхности белковой глобулы было изучено методом антигенного картирования [Аммосова и др., 1997].

В реакции окисления *o*-дианизидина в присутствии ИУК проявляемый конкурентный тип ингибирования свидетельствовал о том, что *o*-дианизидин и индолил-3-уксусная кислота связываются в одном и том же месте активного центра фермента. При этом связывание ИУК препятствовало как связыванию, так и превращению *o*-дианизидина (рис. 59). Тогда как по отношению к гидрохинону тип ингибирования несколько другой. ИУК и гидрохинон связывались в различных местах активного центра, однако, если индолил-3-уксусная кислота связывалась на поверхности фермента, то дальнейшее превращение гидрохинона становилось невозможным. Это может наблюдаться вследствие удаленности мест связывания эффектора и субстрата или в результате конформационных изменений глобулы фермента при связывании ингибитора, или наличием регуляторного участка на поверхности белковой глобулы (рис. 59). Причем при pH 4,5–6,5 тип ингибирования ИУК пероксидазы в реакции окисления гидрохинона неконкурентный, однако при увеличении pH он меняется и становится смешанным. При этом ухудшалось связывание субстрата, т.е. при наличии ИУК происходит понижение сродства гидрохинона к активному центру фермента. Однако, если все-таки гидрохинон связался в активном центре, то дальнейшее его превращение ухудшалось. Причем связывание ИУК с пероксидазой

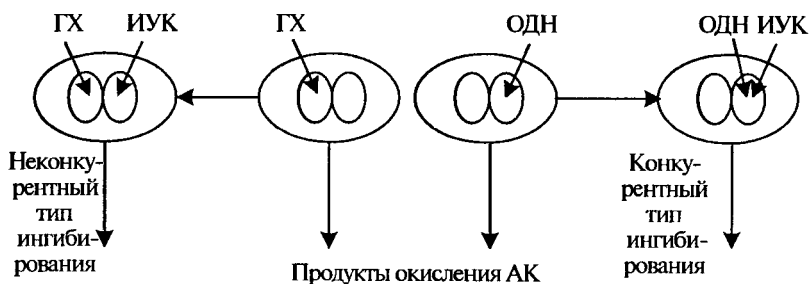


Рис. 59. Влияние ИУК на реакции пероксидазного окисления гидрохинона и *o*-дианизида.

зависело от рН среды и природы субстрата. Субстраты, имеющие близкую с ИУК полярность, значительно повышали эффективность связывания ингибитора с пероксидазой. Поэтому преимущественным местом связывания ИУК и *o*-дианизида в активном центре пероксидазы, по-видимому, должна быть гидрофобная область. Тогда как для гидрохинона местом связывания является область на поверхности фермента, содержащая большее число полярных или заряженных аминокислотных остатков. Подтверждением различных мест связывания *o*-дианизида и гидрохинона в активном центре пероксидазы служат данные по совместному пероксидазному окислению этих субстратов.

Использование ИУК в качестве ингибитора реакций пероксидазного окисления АК позволило определить место локализации участка связывания молекул аскорбиновой кислоты в активном центре пероксидазы. По-видимому, таким участком является дистальная область активного центра пероксидазы. Связывание ИУК в этой области при низких концентрациях субстрата создает конкуренцию за участок связывания, проявляемую в реакциях пероксидазного окисления АК, когда в активном центре фермента связывается по крайней мере одна молекула субстрата. При связывании двух и более молекул АК с пероксидазой наблюдается ускорение реакции окисления АК, что, возможно, вызвано кооперативными взаимодействиями между участками связывания этих двух молекул субстрата. Использование ИУК позволяет высказать предположение, что участки связывания молекул АК пространственно удалены; проявлением этого является неконкурентный характер ингибирования пероксидазы ИУК при окислении АК в присутствии второй молекулы субстрата. При этом связывание ИУК в активном центре пероксидазы создает препятствие

для протекания реакции пероксидазного окисления АК. Однако ингибитор проявляет неконкурентный характер ингибирования при окислении двух и более молекул АК (рис. 60).

Сложность механизмов пероксидазного окисления органических субстратов, таких как *o*-дианизидин, гидрохинон, аскорбиновая кислота, фенотиазины и другие, позволяет предположить, что область активного центра пероксидазы разделена на несколько участков, где могут упорядоченно связываться окисляемые субстраты, и регуляторный участок, связывание в котором субстратов может регулировать протекание каталитического процесса. Последовательное связывание в этих участках субстратов создает условия для управления ферментативным процессом, основанного на принципе корпоративного взаимодействия субстратов.

Наличие регуляторного участка на поверхности белковой глобулы фермента выявлено в исследованиях реакций совместного окисления аскорбиновой кислоты и ферроцианида калия (рис. 61), а также аскорбиновой кислоты и гидрохинона (рис. 62). Проведенное картирование активного центра пероксидазы на основании кинетических данных индивидуального и совместного окисления субстратов позволило выделить два разных участка в активном центре пероксидазы, связывание в которых субстратов обусловлено природой и индивидуальностью их строения. Осо-

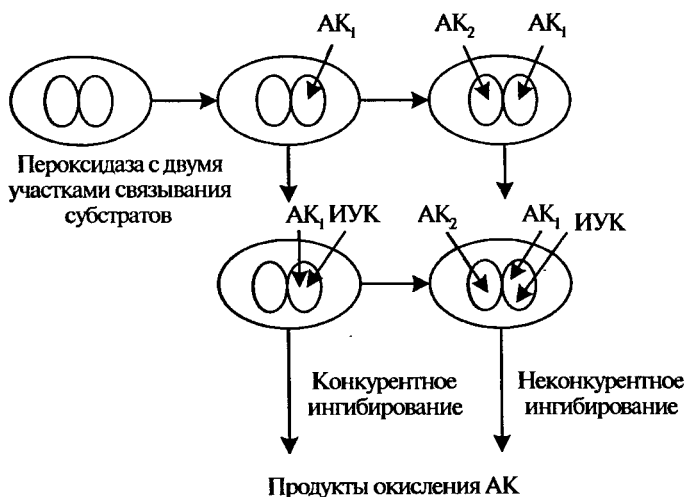


Рис. 60. Участие индолил-3-уксусной кислоты в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты.

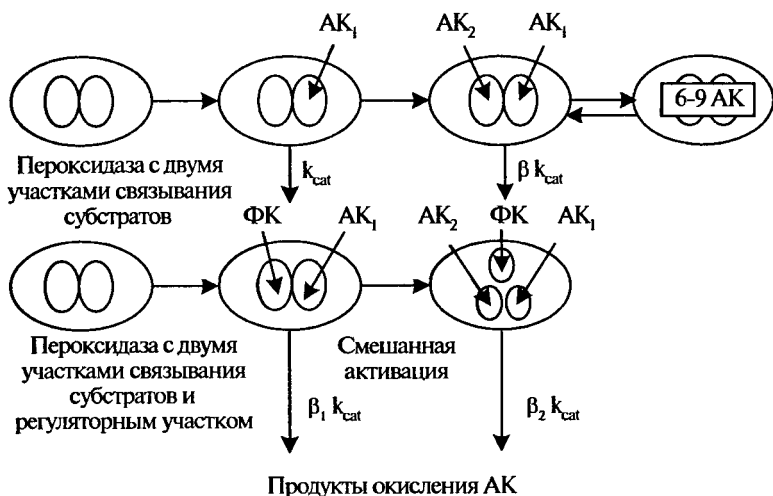


Рис. 61. Схема механизма совместного окисления аскорбиновой кислоты и ферроцианида калия.

бенно это проявляется в реакциях совместного окисления субстратов при осуществлении которых утрачивается неизбирательность в действии фермента и приобретает специфичность выбора окисляемого субстрата, а также устанавливается упорядоченное окисление субстратов. Т.е. каждый из участвующих в реакции субстра-

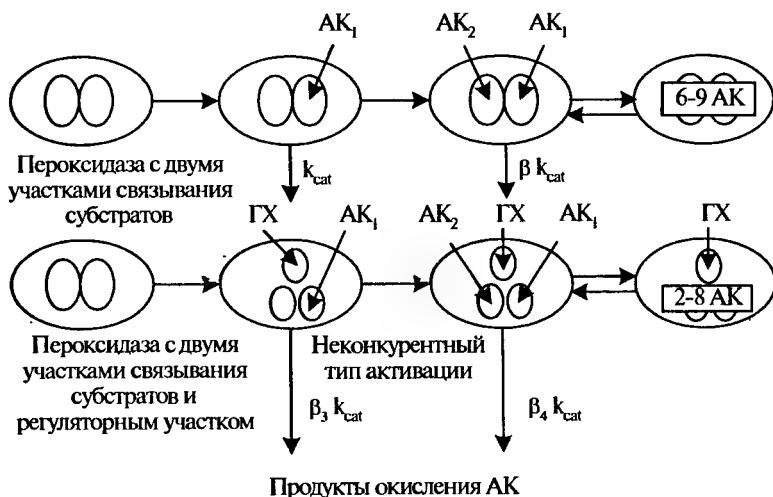


Рис. 62. Механизм совместного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона.

тов приобретает сродство к индивидуальному участку связывания в активном центре фермента, которое условно можно обозначить согласно природе связывающихся субстратов. Один участок связывания *o*-дианизидина, а другой — гидрохинона (рис. 59). В *o*-дианизидиновом участке кроме *o*-дианизидина среди исследуемых нами субстратов могут связываться: хлорпромазин, ИУК, триптофан, строфантин G, аскорбиновая кислота, НАДН, амид III, салицилат натрия, а в гидрохиноновом участке — ферроцианид калия, трифтазин, тиопроперазин, дигоксин. Причем субстраты, связывающиеся в одном участке, могут конкурировать между собой за участок связывания, что проявляется в дифференцированном их окислении. При этом избирательность обусловливается природой субстрата и его сродством к участку связывания, доступностью электроннотранспортных путей к гемину.

Наличие обширной субстратсвязывающей области в активном центре пероксидазы создает условия для связывания сразу несколькими молекулам субстратов одинаковых или разных по строению, при возможности только одному из них участвовать в каталитическом процессе. Тогда как действие другого субстрата проявляется в регулировании (активировании или ингибировании) ферментативной реакции. При этом реализуется принцип: один окисляется, а другой регулирует каталитический процесс. Причем разные по природе субстраты связываются в различных участках активного центра фермента или в области расположения регуляторного участка.

Исследование реакций индивидуального и совместного окисления субстратов позволило выявить наличие в активном центре пероксидазы по крайней мере двух функциональных групп, участвующих в катализе (табл. 18). Значения *pK* этих групп могут изменяться в определенных пределах в зависимости от природы окисляемого субстрата. Одной из них может быть карбоксильная группа [Ugarova et al., 1984; Рогожин, 1984], а другой — имидазол гистидина (His-42) [Jamada, Jamasaki, 1974; Jamada et al., 1975]. Две ионогенные группы с *pK* 3,5 и 5,5 были выявлены при исследовании комплексообразования амида III с пероксидазой [Рогожин, 1984]. При измерении Фурье-ИК-спектров карбонил-пероксидазы хрена интенсивность поглощения при 1934 и 1905 см^{-1} зависело от *pH* среды. Отмечено возрастание поглощения при 1905 см^{-1} при ионизации группы с *pK* 4,0, понижающееся при ионизации группы с *pK* 8,7. Авторами [Holzbaur et al., 1996] выс-

Таблица 18

Величины рК-групп активного центра пероксидазы, выявленные при исследовании реакций индивидуального и совместного окисления субстратов

Субстраты индивидуального и совместного пероксидазного окисления	Показатель проявления функциональной группы	Величина рК-группы
Аскорбиновая кислота	$\lg k_{cat}$ $\lg k'_{cat}$	6,00 6,50
Аминазин	$\lg K_m$	6,00
Аминазин и ферроцианид калия	$\lg K_a$ $\lg \alpha$	5,75 6,19
Трифтазин	$\lg k_{cat}$ $\lg (k_{cat}/K_m)$	4,90 5,60
Тиопроперазин	$\lg k_{cat}$ $\lg (k_{cat}/K_m)$	5,40 4,70
Тиопроперазин и о-дианизидин	Смена типа ингибирования с антиконкурентного на конкурентный	5,5–6,0
Тиопроперазин и строфантин G	Смена типа активирования с бесконкурентного на смешанный	6,0–6,5
Аминазин и строфантин G	Смена типа ингибирования со смешанного на конкурентный	6,0–6,5
Трифтазин и строфантин G	Смена типа ингибирования с неконкурентного на смешанный	6,0–6,5
Аскорбиновая кислота и норадреналин	Смена типа активирования со смешанного на синергический	5,0–5,5
Норадреналин и о-дианизидин	Смена типа ингибирования с конкурентного на смешанный	5,0–5,5
Аскорбиновая кислота и викасол	Проявление конкурентного типа ингибирования	6,0–6,5
Викасол и о-дианизидин	Проявление конкурентного типа ингибирования Смена типа ингибирования с конкурентного на смешанный	6,0–6,5 6,5–7,0

казано предположение, что выявленные ионогенные группы могут принадлежать аминокислотным остаткам His-42 и Arg-38 соответственно.

Методами химической модификации и ингибиторного анализа с использованием амида III подтверждено, что участки связыва-

ния полярных и гидрофобных субстратов пероксидазы в активном центре фермента пространственно удалены. Причем используя водорастворимые карбодиимиды и окрашенный нуклеофил, установлено, что в участке связывания *o*-дианизидина располагается одна карбоксильная группа. Модификация этой COOH-группы оказывает влияние на скорость переноса электрона с донора водорода — *o*-дианизидина на окисленные формы пероксидазы E_1 и E_2 , при этом улучшается связывание окисляемого субстрата. Тогда как на процесс окисления ферроцианида, который связывается в гидрохиноновом участке, модификация этой карбоксильной группы влияние не оказывает.

Таким образом, на основании проведенных исследований химической модификации пероксидазы можно высказать предположение, что в активном центре пероксидазы имеется несколько участков связывания субстратов. Поэтому поверхностными и доступными модификациями являются лишь те боковые функциональные группы белка, которые входят в участок активного центра фермента, предназначенного для связывания *o*-дианизидина. Основная часть функциональных групп пероксидазы, в том числе и группы, входящие в состав других участков активного центра, маскированы либо располагаются внутри белковой глобулы, либо защищены углеводными остатками и поэтому недоступны модифицирующим агентам. Такая структурная организация пероксидазы обусловлена особенностями механизма действия этого фермента, т.е. необходимостью защищать каталитически важные функциональные группы от действия свободных радикалов — промежуточных продуктов пероксидазного окисления субстратов, которые могут инактивировать фермент.

Пероксидазу по своему устройству можно отнести к мембранным белкам поверхностные углеводные радикалы которых способны определять специфичность связывания фермента в мембранных структурах клетки. Причем гликозилированные участки расположены достаточно далеко от активного центра пероксидазы и поэтому не влияют на протекание каталитического процесса (рис. 63). Однако углеводы среды могут регулировать каталитическую активность и стабильность фермента. При этом, если поверхностные углеводы выполняют защитную функцию, т.е. экранируют белковую глобулу от действия свободных радикалов среды, ориентируют фермент в мембранных структурах, то углеводы среды способны ингибировать пероксидазу и понижая

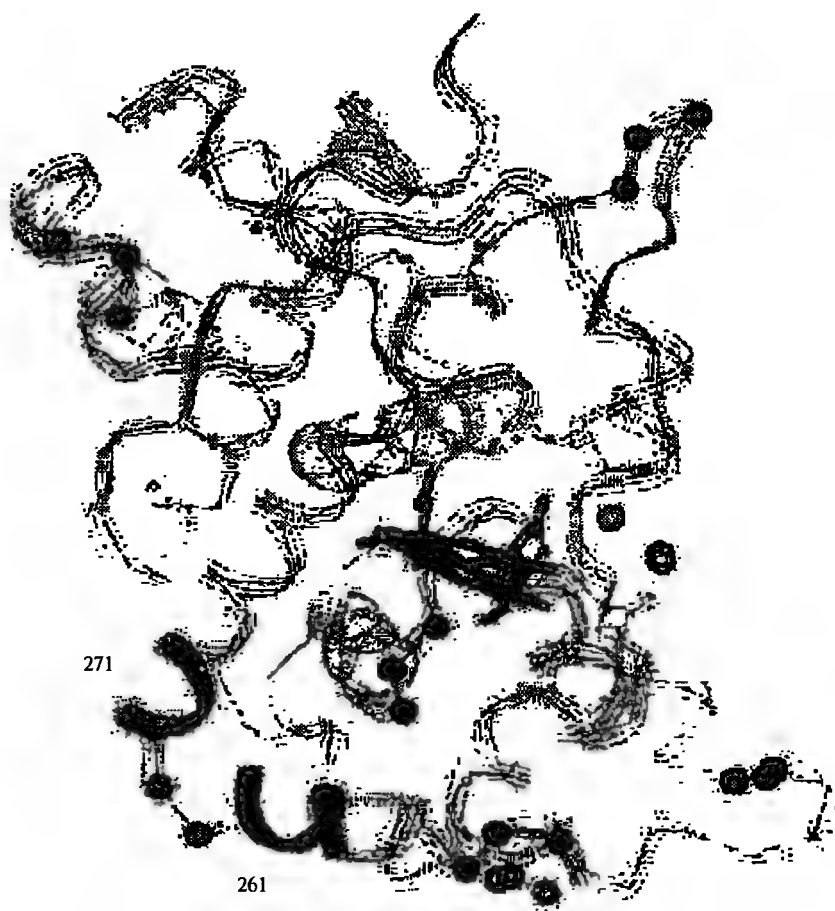


Рис. 63. Структура молекулы пероксидазы хрена с выделенными участками, соответствующими антигенными детерминантами для моноклональных антител PO_1 и $36F_9$. Черными кружками обозначены центры гликозирования [Игнатенко и др., 2003].

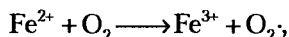
стабильность фермента. Таким образом, совместная деятельность углеводов среды и моносахаридов, расположенных на поверхности белковой глобулы, направлена на регулирование механизма действия фермента в биогенных системах, где пероксидаза совместно с другими низкомолекулярными (аскорбиновая кислота, токоферолы, флавоноиды и др.) и высокомолекулярными (СОД, каталаза) антиоксидантами способна выполнять специализированную функцию по защите биогенных систем от действия активных форм кислорода.

ГЛАВА IV

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

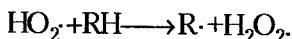
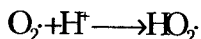
4.1. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

Растения и животные могут существовать только в атмосфере, содержащей кислород, который обеспечивает протекание аэробных метаболических процессов в клетках, а также образование в них свободных радикалов и перекисных соединений органической и неорганической природы [Мерзляк, Соболев, 1975; Прайор, 1979; Абрамов, Оксенгендлер, 1985]. При действии неблагоприятных факторов интенсивность этих процессов может возрастать [Шевченко и др., 1980; Мерзляк, Румянцев, 1981; Лукатин, 1987]. Клетка располагает несколькими специализированными механизмами защиты в составе противooksидлительной системы, в действии которых принимают участие следующие соединения: глутатион, аскорбат, каротиноиды и ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатионредуктаза) [Fridovich, 1986]. За счет наличия баланса антиоксидантов и прооксидантов в тканях поддерживается нормальный гомеостаз живых организмов, в которых физиологически обусловлена генерация свободных радикалов, т.е. активных форм кислорода: $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot}$, H_2O_2 , $HO\cdot$ [Elsotner, 1982; Меньщикова, Зенков, 1997]. Генерация супероксидного радикала может происходить в результате активности NADPH-цитохром-b5-редуктазы, митохондриальной NADH-дегидрогеназы, ксантиноксидазы [Fried et al., 1973; Thompson et al., 1987] и пероксидазы [Halliwell, 1978], а также фотодинамического действия света на хлорофилл, приводящего к образованию синглетного кислорода или супероксид радикала [Elsotner, 1982].

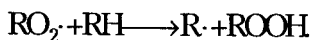
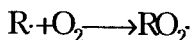


Процесс начинается стадией инициирования, причем в роли инициаторов в основном выступают супероксидный или гидро-

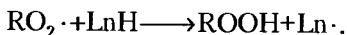
кисильный радикалы. Это наиболее реакционноспособные промежуточные соединения кислорода, обладающие большим сродством к электрону, способные модифицировать молекулы белков, нуклеиновых кислот, разрушать липидные компоненты мембран клеток и т.д. [Владимиров, Арчаков, 1972]:



Образовавшиеся радикалы ненасыщенных жирных кислот ($\text{R}^\bullet$) далее взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы ($\text{RO}_2^\bullet$), а те в свою очередь вступают в реакцию с новой молекулой жирной кислоты с образованием $\text{R}^\bullet$ и накоплением гидроперекисей липидов (ROOH).



Процесс подавляется антиоксидантами, которые способны реагировать со свободными радикалами, образуя малоактивные радикалы, не способные вступать в реакцию с новыми молекулами ненасыщенных жирных кислот.



Свободнорадикальные процессы и перекисное окисление липидов необходимо для регулирования липидного состава и проницаемости мембран, а также синтетических и регуляторных процессов в растительных и животных тканях, нормальный уровень которых поддерживается за счет функционирования системы ингибиторов свободнорадикального окисления [Владимиров, Арчаков, 1972]. Срыв в функционировании защитных систем может приводить к развитию окислительного повреждения тканей, развитию окислительного стресса. Накопление активных форм кислорода приводит к инициации перекисного окисления липидов в биологических мембранах, следствием чего является частичная их дезинтеграция, проявляемая в увеличении проницаемости ионов [Carmak, Marschner, 1988], изменении степени гидрофильности и микровязкости мембранных липидов [Владимиров, 1987], а также степени олигомеризации мембранных белков и их взаимодействия с липидами [Шер-

стнев, Сулейманов, 1986]. Следствием этих процессов может быть изменение условий функционирования рецепторных комплексов, ответственных за связь с гормональными веществами и нарушение регулирования метаболических процессов. Для избежания существенного повреждения функциональных систем в организме существует система ограничивающая действие свободных радикалов, ответственная за поддержание их концентрации на достаточно низком уровне. Составной частью этой системы защиты являются в тканях растений естественные антиоксиданты [Островская, 1993].

Активные формы кислорода выполняют роль вторичных посредников клеточной активации и пролиферации, и служат компонентами свободно-радикального механизма в регуляции размножения клеток [Бурлакова и др., 1975, Вартанян и др., 1992]. В случаях инфекционных заболеваний увеличение содержания в тканях активных форм кислорода, проявляется в активировании фитоиммунитета [Аверьянов и др., 1987; Аверьянов, Лапикова, 1988а; 1988б].

Для различных стрессов, возникающих под действием неблагоприятных факторов среды (инфекции, различные ксенобиотики, гербициды, тяжелые металлы, ультрафиолетовое излучение, рентгеновское облучение и др.), является характерным повышение в тканях содержания супероксидных радикалов и других активных форм кислорода, активизация ПОЛ [Островская, 1993; Верболович и др., 1989; Каюшин и др., 1970; 1973; Львов, Львова, 1988; Наумова и др., 1992]. Разнообразие факторов и неспецифичность их действия проявляется в интегрировании механизмов повреждения биогенных систем.

К наиболее широко распространенным факторам физического воздействия на семена и вегетирующие растения в научных исследованиях, и в производственной практике относится ионизирующее излучение [Мухин и др., 1993]. Показана неоднозначность реакции семян и растений на ионизирующее излучение, относящихся к различным классам, семействам, родам, видам и сортам. Рядом авторов [Сарапульцев и др., 1989а; 1989б; Сарапульцев, Гераськин, 1988; 1991; Гераськин, Сарапульцев, 1991] выдвинута концепция видовой дифференциации по уровню радиорезистентности высших растений в рамках крупных ботанических кариотаксонов, объясняя это явление с позиции структурных параметров клеточного ядра, высказывая предположение, что в основе внутривидового полиморфизма дифференциации по радиорезистентности лежат факторы структурной природы, связанные с особенностями тонкой структурной организации генома [Сарапульцев и др., 1989а; 1989б].

В опытах на многих культурах, где применялись разного рода сильные воздействия, экспериментаторы отмечали разную степень ингибирования разных растений, особенно в диапазоне сублетальных доз, когда на фоне общего сильнее поражения отдельные растения, или их группы нормально росли и развивались, незначительно отличаясь от контроля [Мухин и др., 1993; Ballare et al., 1991]. УФ излучение вызывает повреждения в ДНК: нарушаются процессы транскрипции и репликации, вследствие образования свободных радикалов и гидроперекисей азотистых оснований, приводящие к сшивкам, с формированием пиримидиновых димеров [Peak et al., 1973; Kantor, Ritter, 1983]. УФ-облучение вызывает нарушение проницаемости мембран эритроцитов и дрожжей [Sonne, 1929; Рошупкин, 1980], изменение физико-химических характеристик липидного бислоя и вследствие этого потере связывающей активности мембранного опиоидного рецептора [Белоконева и др., 1993]. Выявлена положительная корреляция между скоростью УФ-индуцированного гемолиза эритроцитов и перекисным фотоокислением липидов в мембране [Roschupkin, Pelenitsyn, 1975]. Показано [Roschupkin et al., 1979], что фотоокисление лежит в основе обнаруженного ранее [Konev et al., 1978] нарушения функционирования различных ферментов и их ансамблей, связанных с мембраной. Причем окисление липидов под действием УФ-облучения протекает по цепному механизму и аналогично автоокислению, где роль облучения сводится к генерации свободных радикалов, инициирующих цепи окисления [Bateman, Gee, 1948]. Супероксидный ионрадикал, образующийся в УФ-облученной клетке [Cunningham, Johnson, 1985], способен вызывать мутации как прокариотов, так и эукариотических клеток [Brown, Fridovich, 1981; Cunningham, Johnson, 1985]. Аналогичным действием могут обладать и другие активные формы кислорода, регулирование активности которых осуществляется с помощью функционально активных веществ, относящихся к группе антиоксидантов. Возникающие свободные радикалы инициируют перекисное окисление липидов — процесс, который в значительной мере определяет их токсичность. Степень его развития будет зависеть от уровня антиоксидантов и их активности [Островская, 1993]. Например, появление свободных радикалов при старении растений объясняется снижением активности антиоксидантного комплекса, в котором взаимодействуют витамины Е и С [Kunert, Ederer, 1985]. Типичная картина может наблюдаться и при дефици-

те железа и цинка [Carmak, Marschner, 1988; Михалик и др., 1988]. Неспецифичность реакции активных форм кислорода на воздействующий фактор или проявление дефицита может свидетельствовать об их участии в активации регуляторных сил биологических систем, с целью компенсировать возникшие изменения. Реализация их деятельности проявляется в активизации ПОЛ, изменения количества антиоксидантов и т.д. Так, например, показано [Прайор, 1979; Adam et al., 1993], что ответная реакция биологических мембран на усиление ПОЛ молекулярным кислородом выражается в активации каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), в уменьшении окислительного индекса и накоплении МДА. Наиболее эффективными регуляторами ПОЛ являются (в порядке убывания эффективности) каталаза > СОД > ГП. Пероксидаза обладает прооксидантными свойствами, переводя на более высокий уровень регуляции систему ферментативных антиоксидантов за счет образования в процессе пероксидазного катализа свободнорадикальных форм фермента. Опосредованное действие ПОЛ показано на регулировании активности протеинкиназы С (ПК-С)- Ca^{2+} и фосфолипидзависимого фермента, который играет ключевую роль в регуляции многих клеточных процессов. ПК-С рассматривается как важнейшее звено в системе трансмембранной передаче сигнала при многих кратковременных и долговременных клеточных ответах, включая пролиферацию и трансформацию [Blake et al., 1987; Пальмина и др., 1994]. Известно, что данные процессы наряду со специфическими регуляторами контролируются работой системы ПОЛ в биологических мембранах, компонентами которой являются продукты ПОЛ и природные антиоксиданты [Бурлакова, 1976]. В работе [Бурлакова и др., 1975] предложена гипотеза о роли свободнорадикальных процессов (в частности, соотношения перекисей липидов и природных антиоксидантов) в регуляции размножения нормальных и опухолевых клеток. При этом система регуляции ПОЛ, основными параметрами которой являются: концентрация перекисей липидов, содержание природных антиоксидантов, состав липидов и структура мембраны, тесно связана с функционированием ПК-С, продукты ПОЛ в зависимости от концентрации могут как активировать, так и ингибировать ПК-С [Мальцева и др., 1990; Hammer et al., 1993].

Роль свободнорадикального окисления в липидной фазе биологических мембран показана для патологических состояний — луче-

вая болезнь, злокачественный рост, токсикозы, Е-авитаминоз, гипер- и гиповитаминоз Д, ишемические и реоксигенационные повреждения, гемолитическая анемия, стрессорные расстройства и т.д. Во всех патологических процессах активацию ПОЛ можно предупредить или ограничивать с помощью антиоксидантов — ингибиторов свободнорадикального окисления, в отсутствии которых наблюдается повреждение мембранных структур клеток. ПОЛ может приводить к разборке мембранных структур и обновлению мембранных фосфолипидов [Мишанин и др., 1992]. Согласно идее Эмануэля и Тарусова ПОЛ является универсальным механизмом повреждения мембранных структур клетки при различных патологических состояниях, действии экстремальных факторов, а также при старении [Тарусов, 1954]. Владимировым Ю.А. и Арчаковым А.И. высказано предположение, что процесс ПОЛ широко распространенное явление в любых живых клетках и мембранных структурах, в основе которых типичная цепная реакция; определяющим результатом действия свободных радикалов является нарушение проницаемости биомембран [Владимиров, Арчаков, 1972].

В развитии свободнорадикальных процессов при кардиомиопатии выделяется несколько фаз. В начале заболевания активация ПОЛ связана с увеличением первичных продуктов пероксидации [Kobayashi et al., 1987; Ефимов, Науменко, 1988; Singal et al., 1988]. В этот период начинается повышение активности и ферментов антиоксидантной защиты [Singal et al., 1988]. При дальнейшем развитии патологии наблюдается резкое уменьшение содержания сиаловых кислот в сарколемме, выраженные субсарколеммальные изменения кардиомиоцитов, набухание митохондрий, расплавление миофибрилл [Adam et al., 1993].

При гипоксии и гипербарической оксигенации (ГБО) наблюдается активация ПОЛ. Причем при гипоксии это происходит за счет накопления восстановителей [Поберезкина и др., 1992], а при ГБО — за счет возрастания кислорода в тканях [Кричевская, 1977]. Интенсификация ПОЛ способствует увеличению вязкости мембран, появлению отрицательного заряда на поверхности мембран, увеличению количества гидрофильных зон, снижению доли липидов, находящихся в жидком состоянии [Формазиук, Щило, 1985]. На начальных этапах ПОЛ способствует «разрыхлению» мембран, вследствие окисления ненасыщенных двойных связей и выталкиванием молекул, содержащих гидрофильные кислородсодержащие перекисные группы из гидрофобного окружения.

Светозависимое перекисное окисление липидов, имеющее характер свободнорадикальной цепной реакции, является причиной повреждения мембран хлоропластов у растений. Окислительный процесс предотвращается каротиноидами, α -токоферолом. Действие антиоксидантов связано с обрывом цепной реакции, в результате чего образуются гидропероксид субстрата и обладающий низкой реакционной способностью свободный радикал ингибитора [Поберезкина и др., 1992]. Антиоксидантный эффект α -токоферола в мембранах усиливается аскорбатом. В присутствии аскорбата α -токоферол может восстанавливать перекись липида до его исходной формы [Дмитриев, Верховский, 1990]. Таким образом, уровень ПОЛ в клетке находится под контролем высоко активной системы антиоксидантной защиты, куда входят низко- и высокомолекулярные соединения, роль которых в повышении резистентности живых организмов будет подробно рассмотрена ниже.

4.2. АНТИОКСИДАНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Важным аспектом в исследовании регуляции клеточного метаболизма является выяснение роли природных компонентов клетки в процессах перекисного окисления липидов. Уровень ПОЛ в нормальных тканях зависит от многих факторов, в частности от содержания антиоксидантов в липидах биологических мембран и свойств самих липидов как субстратов окисления [Бурлакова и др., 1991; Hannemann et al., 1991]. В ПОЛ участвуют преимущественно высоконенасыщенные жирнокислотные остатки арахидоновой, докозагексаеновой, линоленовой кислот, находящиеся в α -положении глицерольного остатка молекулы фосфолипидов [Pikul, Kimmegow, 1990]. Способность к окислению различных мембранных фосфолипидов не одинакова. Легко окисляются фракции фосфотидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилинозита, фосфотидилсерина и кардиолипида [Аристархова и др., 1976].

Антиоксиданты регулируют процессы свободнорадикального окисления, создают оптимальные условия для нормального метаболизма и функционирования клеток и тканей [Бурлакова и др., 1991], их основной функцией в растительных и животных клетках является торможение развития свободнорадикальных процессов окисления.

В основном антиоксиданты по механизму действия можно разделить на две группы [Кения и др., 1993]: 1) высокомолекуляр-

ные соединения — ферменты антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и др.), а также белки (альбумин, трансферрин, ферритин и т.д.), способные связывать ионы Fe и Cu, являющиеся катализаторами свободнорадикальных процессов; 2) низкомолекулярные соединения, к которым относятся стероиды, убихиноны, фосфолипиды, некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, мочевины, мочевины, глутатион, аскорбат, билирубин, токоферолы и др.

Общая антиокислительная активность липидов зависит как от количества биоантиоксидантов и их взаимовлияния, так и от присутствия веществ, которые сами не оказывают антиоксидантного или прооксидантного действия, но способны усилить или ослабить действие биоантиоксидантов [Бабаев, 1987].

Антиоксиданты, ингибирующие окислительные процессы в организмах, в последнее время приобретают все большую известность как регуляторы роста растений [Горбатенко и др., 1993], деления клеток, активаторы проницаемости мембран. Аналогичным действием обладают стероидные гликозиды и амбиол — препарат с высокой рострегулирующей активностью, испытанный на кукурузе, пшенице, ячмене, овсе, декоративных и других культурах, а также препарат Ф, изученный на сельскохозяйственных растениях и животных [Шмальгаузен, 1968]. Показано, что эти антиоксиданты в зависимости от их концентрации в питательной среде дифференцированно стимулируют рост, развитие, побего- и корнеобразование у регенерантов.

Известно, что витамины-антиоксиданты оказывают синергическое действие. Аскорбиновая кислота восстанавливает продукт окисления токоферола α -токофероксид в α -токоферол, витамины С и Р также взаимно обратимо восстанавливаются. Аскорбиновая кислота более стабильна в присутствии метилметионина, так как сульфгидрильные группы способны восстанавливать дегидроаскорбиновую кислоту в аскорбиновую. Метилметионин, поставляющий SH-группы, обеспечивает функционирование глутатионного звена — одного из основных механизмов антиокислительной системы. При этом, он участвует в выведении из организма как активных радикалов, так и избытка радикалов биоокислителей [Солдатов, Воскресенский, 1994]. Липоевая кислота, которая участвует в процессе биологического окисления в липидном и углеводном обмене, коэнзим А также обладают выраженными антиоксидантными свойствами. Под их влиянием увели-

чивается фонд НАДН, что способствует восстановлению окисленного глутатиона [Абрамов, Оксенгендлер, 1985].

В последнее время в основе патогенеза различных заболеваний проявляются механизмы повреждения растений индуцированных патогеном за счет активации свободнорадикальных процессов [Doke, 1983; Doke, Chashi, 1988; Adam et al., 1989; Иванова и др., 1991; El-Zahaby et al., 1993], сопровождающихся селективным повреждением полиненасыщенных жирных кислот [Мезляк, 1989]. Развитие поражения тканей проявляется изменениями относительного содержания полиненасыщенных жирных кислот и, в основном, снижается содержание линолевой и линоленовой кислот, с увеличением доли пальмитиновой кислоты [Глумова и др., 1994]. Выявленные изменения в составе липидов листьев проявляются уже на ранних, досимптомных этапах патогенеза и сохраняются в процессе развития болезни. Снижение доли полиненасыщенных жирных кислот отражает деструктивные повреждения, обусловленные действием патогена на мембранные структуры клеток растений. Этапы повреждающего действия возбудителей заболеваний можно представить следующим образом. Патоген вначале активирует в растительных клетках генерацию свободных радикалов кислорода. Последние, непосредственно или через цепь реакций, инициируют процессы перекисного окисления мембранных липидов, приводя к необратимым деструктивным повреждениям мембран, включая и плазмалемму. В результате нарушаются их барьерные функции, что обычно сопровождается увеличением скорости выхода внутриклеточных электролитов [Глумова и др., 1994]. Следствием повреждения мембран является декомпартментация клеток и выход токсичных соединений, в том числе и фенольной природы, а также солибилизацией пероксидазы из клеточных стенок [Рубин и др., 1975; Метлицкий, Озерецковская, 1984]. В результате создаются благоприятные условия для активации системы пероксидаза-фенолы в диффузатах, приводящей к генерации активных форм кислорода [Аверьянов, Лашкова, 1988б], для подавления образования которых используются антиоксиданты.

Эффективность действия антиоксиданта обусловлена предотвращением окисления SH-групп белков клеток, сохранением состава мембран, биологически активных веществ, информативных молекул и т.д., повреждение которых возникает в результате активации процесса перекисного окисления липидов.

ГЛАВА V

РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ДЕЙСТВИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ

Семена культурных растений в отсутствие воды и при низкой температуре находятся в состоянии вынужденного покоя. Однако с возрастом оводненности в семенах активируются основные метаболические процессы и повышается дыхание до максимального уровня, характеризующие их рост и развитие [Николаева и др., 1985]. Период прорастания делится на три этапа [Обручева, Антипова, 1997]: 1) активация метаболизма (этап физического набухания); 2) подготовка к началу роста растяжением (наклеывание семян за счет перехода к растяжению клеток осевых органов зародыша); 3) собственно рост органов проростка. Известно, что для нормального прорастания в воздушно-сухих семенах должны присутствовать все компоненты белок-синтезирующей системы: рибосомы, тРНК, факторы инициации и элонгации, аминокислоты и аминоацил-тРНК-синтетазы, все ферменты метаболизма, белки теплового шока и их мРНК [Гумелевская и др., 1995; Vazquez-Ramos et al., 1988]. Во влажных семенах наблюдается активное потребление кислорода, который может вызывать окислительное повреждение тканей. В развитии окислительного стресса играют роль активные формы кислорода [Владимиров, Арчаков, 1972; Howarth, 1990]. Накопление АФК в клетках приводит к нарушению протекания процессов транскрипции и репликации, изменяет состав липидов мембран [Вартанян и др, 1992]. Супероксидные радикалы модифицируют белки, нарушают структуру ДНК, разрушают гормоны и другие функционально активные вещества [Коган и др., 1992; 1997]. Поэтому изучение проявления компенсаторных механизмов в семенах на действие АФК является общебиологической задачей.

В основе действия механизмов покоя заложено функционирование различных физиолого-биохимических процессов. Контроль за этими процессами осуществляется комплексом биоло-

гически активных веществ, которые регулируют рост и развитие растительного организма, обеспечивая сохранение его жизнеспособности. Вхождение в состояние покоя сопровождается понижением активности биосинтетических процессов и дыхания митохондрий, последнее вызывается разобщением окислительного фосфорилирования, переключением аэробных метаболических процессов на анаэробные. При этом активность анаэробных метаболических систем начинает преобладать над активностью аэробных процессов. Показателями анаэробных метаболических процессов могут служить ферменты глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа, а аэробных — пероксидаза [Рогожин, Егорова, 1990]. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является ключевым ферментом пентозофосфатного пути превращения углеводов, катализирует реакции окисления глюкозо-6-фосфата в присутствии НАДФ, который необходим для метаболизма липидов (жирных кислот и стероидов). При этом известно, что стероидные гликозиды могут в организме выполнять роль антиоксидантов, регулировать проницаемость мембран и активировать процессы деления и роста клеток. Алкогольдегидрогеназа катализирует обратимые реакции окисления алифатических спиртов с участием НАД (рис. 64). Отношение концентраций альдегида к спирту отражает уровень протекания анаэробных биоэнергетических процессов. Снижение этого соотношения должно сопровождаться активацией катаболических процессов, а повышение — углублением гипобиотического состояния. Однако этот регуляторный механизм в семенах культурных и дикорастущих растений недостаточно изучен.

Интенсивность аэробных процессов может быть оценена по активности пероксидазы, которая совместно с СОД и каталазой входит в единую систему антиоксидантной защиты живых организмов, предотвращающих разрушительное действие активных форм кислорода. Фермент способен катализировать реакции окисления различных биологически активных соединений (НАДН, ИУК, аскорбиновая кислота, флавоноиды и др.), среди которых следует выделить антиоксиданты, соединения способные подавлять образование свободных радикалов, ингибировать ПОЛ (рис. 64). Таким образом между пероксидазой и антиоксидантами должна наблюдаться взаимная зависимость, которая, к сожалению, недостаточно изучена.

стемы. Однако взаимодействие их основных метаболитов, принимающих участие в формировании гипобиотических состояний у живых организмов, обитающих в экстремальных условиях, мало исследована.

5.1. ИНДУЦИРОВАНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ОБЛУЧЕНИЕМ СЕМЯН ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

Проявлением различных стрессов, возникающих под действием неблагоприятных факторов среды (инфекции, различные ксенобиотики, гербициды, тяжелые металлы, ультрафиолетовое излучение, рентгеновское облучение и др.), является характерное повышение в тканях содержания супероксидных радикалов и других активных форм кислорода, активизации ПОЛ [Островская, 1993; Верболович и др., 1989; Каюшин и др., 1970; 1973; Львов, Львова, 1988; Наумова и др., 1992]. Супероксидный ион-радикал, образующийся в УФ-облученной клетке, способен вызывать мутации как прокариотов, так и эукариотических клеток [Brown, Fridovich, 1981]. Аналогичным действием могут обладать и другие активные формы кислорода, регулирование активности которых осуществляется с помощью функционально активных веществ, относящихся к группе антиоксидантов. Возникающие свободные радикалы инициируют перекисное окисление липидов — процесс, который в значительной мере определяет их токсичность. Степень его развития будет зависеть от уровня антиоксидантов и их активности [Островская, 1993]. Неспецифичность реакции активных форм кислорода на воздействующий фактор может свидетельствовать об их участии в активации регуляторных сил биологических систем с целью компенсировать возникшие изменения. Реализация их деятельности проявляется в активизации ПОЛ, изменении количества антиоксидантов и т.д.

Поэтому нами была изучена динамика процесса перекисного окисления липидов и содержание антиоксидантов при набухании семян пшеницы, а также генерация продуктов ТБК в проростках пшеницы в течение первых дней проращивания и накопление продуктов ПОЛ в проростках после ультрафиолетового облучения семян.

Известно, что процесс набухания семян и последующий рост проростков и корней, сопровождаются активацией аэробных ме-

таболических процессов. Условиями для прорастания всех семян являются достаточная влажность, доступ кислорода и благоприятная температура [Николаева и др., 1985]. По мере поступления воды в семена в них активизируются метаболические процессы. Причиной положительного влияния кислорода на прорастание семян может быть активизация и поддержание на достаточном уровне процессов дыхания, а также активное окисление веществ, тормозящих процесс прорастания [Якушкина, 1993]. Поступающий в митохондрии кислород инициирует протекание окислительного фосфорилирования, обеспечивающего синтез АТФ, наличие которого будет определять интенсивность анаболических процессов.

Как известно, зерно злаков состоит из частей (зародыша, эндосперма и щитка), выполняющих разные функции [Батыгина, 1987; Калинин, 1986]. Эндосперм представлен клетками, содержащими запасные питательные и функционально активные вещества, в частности, ауксины, гиббереллины, цитокинины и другие регуляторы роста. Деление клеток зародыша обеспечивает формирование различных органов растения, тогда как основной функцией щитка (скутеллума) является осуществление связи между эндоспермом и всеми структурами зародыша, посредством специализированного эпителиального слоя, в котором имеется большое количество ферментов и происходят изменения в составе веществ, поступающих из эндосперма в зародыш, а в дальнейшем в проросток.

На рис. 65 показана динамика накопления малонового диальдегида и антиоксидантная активность в зародыше, щитке и эндосперме в процессе набухания семян пшеницы в дистиллированной воде. Из рисунка видно, что в течение 24 часов набухания в различных частях семени отмечается плавное возрастание АОА только в эндосперме в 3,3 раза, зародыше — 2,7 раза, а в щитке отмечается понижение антиоксидантной активности на 22–35% (рис. 65, а). Хотя АОА щитка была в начале набухания выше в 12 раз, чем в эндосперме и в 2 раза, чем в зародыше. Повышенная АОА в эндосперме и зародыше обеспечивается возрастом содержания антиоксидантов, способных подавлять свободнорадикальные процессы, что проявляется в своеобразной динамике ПОЛ в этих частях семени. Причем уровень ПОЛ находится в обратной зависимости и возрастает в эндосперме в 2,2 раза, зародыше — в 3,3 раза, с резким увеличением в щитке в 7,2 раза (рис. 65,

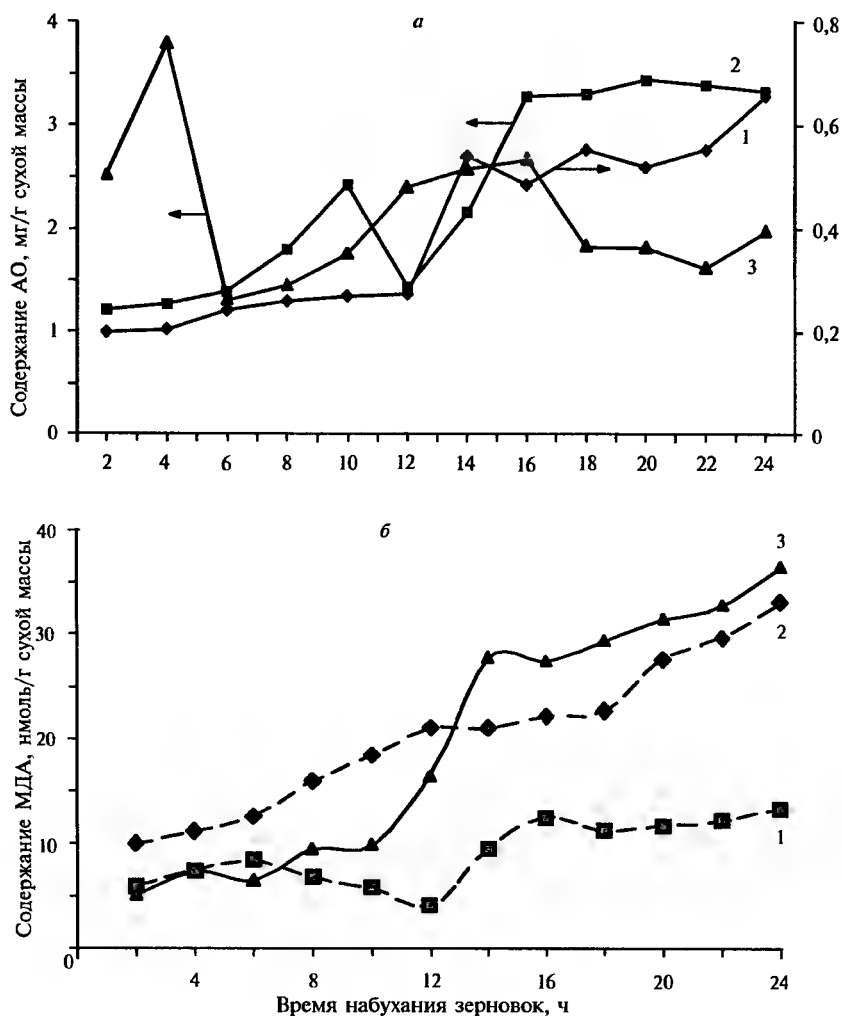


Рис. 65. Динамика накопления антиоксидантов (а) и малонового диальдегида (б) в эндосперме (1), зародыше (2) и щитке (3) семян пшеницы сорта Приленская 19 от времени набухания. Условия: 23 °С; среда набухания — дистиллированная вода.

б). Из приведенных данных видно, что наиболее активно деструктивные процессы протекают в щитке семени пшеницы, что, возможно, имеет важное биологическое значение в пусковом механизме при выходе семян из состояния покоя. Можно предположить, что активация ПОЛ в щитке приводит к нарушению структуры его мембран, вследствие этого создается возможность

поступления из эндосперма веществ, повышающих ростовую активность зародыша.

Активность ПОЛ в живых системах находится под контролем высокоактивной системы антиоксидантной защиты, в состав которой входят соединения, способные захватывать свободный радикал, предотвращающие дальнейшее протекание процесса свободнорадикального окисления — антиоксиданты. Поэтому нами изучена динамика накопления малонового диальдегида и содержания интегрального количества антиоксидантов в процессе прорастания семян в течение первых 8 дней. Поскольку нас интересовало содержание продуктов ТБК и антиоксидантов в первые дни прорастания семян, когда только начинает формироваться корневая система и проросток растения, то в дальнейшем показатели ПОЛ и АО определялись суммарно в проростке, корнях и эндосперме (рис. 66). Из рисунка 66 видно, что содержание МДА и антиоксидантов в проростках в процессе прорастания семян различается. Накопление антиоксидантов в проростках происходит значительно медленнее, чем увеличение содержания продуктов ТБК. В первые пять дней прорастания проростка перекисное окисление липидов возрастает в 7 раз, а содержание антиоксидантов увеличивается всего в 2,0–2,5 раза.

Плавное возрастание содержания антиоксидантов, возможно, связано с тем, что на начальных этапах прорастания проростков активность ПОЛ в них подавляется за счет резервного количества АО, которые накапливаются в семенах в период их формирования осенью. Синтез новых антиоксидантов требует больших энергетических затрат, которые возможны только при активной работе фотосинтетического аппарата проростка, что возможно только в более поздние сроки.

Динамика ПОЛ и содержание антиоксидантов в проростках пшеницы было изучено на 4–7 день их проращивания (табл. 19). Количество МДА и антиоксидантов в зеленых проростках колебалось в пределах 100–284 и 68,4–159, корнях — 87–100 и 38,5–



Рис. 66. Изменение содержания малонового диальдегида (1) и антиоксидантов (2) в проростках пшеницы сорта Приленская 19.

Таблица 19

**Содержание МДА и антиоксидантов в эндосперме, корнях и зеленых проростках
пшеницы сорта Приленская 19**

Время прораста- ния, сут	МДА, нмоль/г сухой массы (%)			Антиоксиданты, мг/г сухой массы (%)		
	эндосперм	корни	зеленые проростки	эндосперм	корни	зеленые проростки
4	26,3 ± 1,4 (100)	53,4 ± 4,2 (100)	219 ± 12 (100)	0,58 ± 0,18 (100)	1,69 ± 0,5 (100)	3,01 ± 0,8 (100)
6	39,4 ± 3,1 (149)	46,6 ± 3,6 (87,4)	623 ± 18 (284)	0,38 ± 0,09 (65,5)	0,65 ± 0,2 (38,5)	2,06 ± 0,4 (68,4)
7	45,7 ± 3,3 (174)	53,5 ± 3,8 (100,2)	494 ± 15 (225)	0,56 ± 0,12 (95,8)	1,98 ± 0,5 (117)	4,79 ± 0,9 (159)

117, а в эндосперме — 100–174 и 65,5–100 процентов соответственно. Значения малонового диальдегида в эндосперме и корнях проростков пшеницы различаются незначительно, в пределах 26,3–45,7 и 46,6–53,5 нмоль/г сухой массы соответственно, тогда как в зеленых проростках концентрация МДА в 4–15 раз выше и колеблется от 219 до 623 нмоль/г сухой массы. Содержание антиоксидантов в эндосперме — 0,379–0,579, корнях — 0,65–1,98, зеленых проростках — 2,06–4,79 мг/г сухой массы. Из таблицы 19 видно, что изменение концентрации малонового диальдегида в проростках всегда находится в обратной зависимости от содержания в них антиоксидантов. Причем скорость ПОЛ, определяемая в различных частях растения (зеленых проростках, корнях и эндосперме зерновок), различна. Наиболее высокий уровень ПОЛ и антиоксидантов наблюдается в зеленых проростках, а затем по убывающей в корнях и эндосперме.

Известно, что ультрафиолетовое излучение является инициатором активации процессов ПОЛ в растительных и животных тканях [Sonpe, 1929; Рошупкин, 1980]. Эффект действия УФ-излучения связан с нарушением целостности мембран клеток вследствие повреждения липидов и, в частности, ненасыщенных жирных кислот. Любой живой организм реагирует на УФ-излучение, причем степень выраженности ответной реакции определяется заложенными в нем адаптационными возможностями. Реакция организма на воздействие может подразделяться в зависимости от силы и длительности действия раздражителя на два этапа — срочной и долговременной адаптации [Меерсон,

1986], где срочный этап адаптации возникает непосредственно после начала действия раздражителя, реализуется на базе готовых, ранее сформировавшихся механизмов. Тогда как долговременный этап адаптации инициируется продолжительным воздействием стрессирующего фактора и на основе многократной реализации срочной адаптации. При действии УФ-излучения важное значение для организма имеет мобилизация компенсаторных механизмов, среди которых важное значение имеют регуляторные механизмы антиоксидантной защиты, целенаправленное действие которых позволяет выживать организмам даже в самых экстремальных условиях. Одним из компонентов таких механизмов является перекисное окисление липидов, реализуемое в организме за счет активации свободнорадикальных процессов, интенсивность которых определяется по количеству образовавшегося малонового диальдегида, хотя малоновый диальдегид — не единственный ТБК-активный продукт. Развитию спонтанного перекисного окисления липидов в тканях препятствуют содержащиеся в них антиоксиданты.

Таким образом, по интенсивности протекания перекисного окисления липидов в различных органах можно оценивать неспецифические адаптационные возможности организма, а по содержанию антиоксидантов судить о его компенсаторном потенциале. При этом эти два показателя обычно взаимосвязаны и взаимозависимы.

На рисунке 67 представлены в динамике данные по содержанию продуктов ТБК и антиоксидантов в проростках пшеницы, семена которых с влажностью 5–6% подвергались ультрафиолетовому облучению в течение 10-ти часов, с периодичностью отбора проб в течение первого часа через 1, 5, 10, 15, 20, 30 и 60 мин, а затем каждый час. Видно, что в течение всего времени УФ воздействия изученные показатели (ПОЛ и АО) претерпевают фазовые изменения. Первые 20 мин УФ-облучения семян (рис. 67, а, д) вызывает последующее резкое снижение содержания продуктов перекисного окисления липидов в проростках и максимальное возрастание процессов, ингибирующих образование супероксидных радикалов, что проявляется в увеличении интегрального состава антиоксидантов в первые 2–3-и дня их роста. Продолжение воздействия ультрафиолетового излучения на семена в течение 0,5–1 часа приводит к дальнейшему возрастанию компенсаторных механизмов, что проявляется во

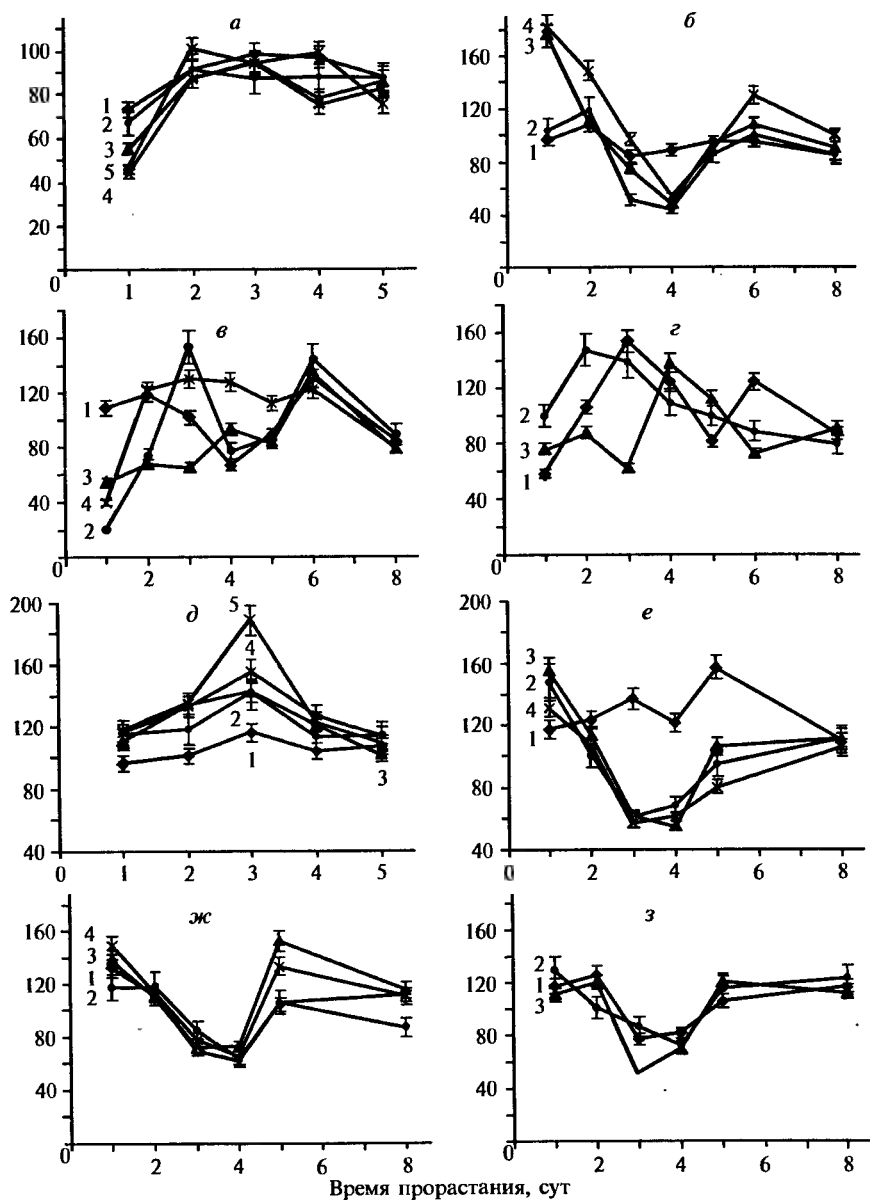


Рис. 67. Влияние УФ-облучения зерновок пшеницы сорта Приленская 19 на содержание малонового диальдегида (а, б, в, г) и антиоксидантов (д, е, ж, з) в их зеленых проростках. Время УФ-облучения зерновок пшеницы, мин: а и д — 1–1, 2–5, 3–10, 4–15, 5–20 мин; б и е — 1–30, 2–60, 3–120, 4–180 мин; в и ж — 1–240, 2–300, 3–360, 4–420 мин; г и з — 1–480, 2–540, 3–600 мин. По оси ординат — значения соответствующих параметров (в %), за 100% приняты значения МДА и АО проростков, не подвергавшихся УФ-облучению.

временной нормализации в проростках показателей ПОЛ и АО (рис. 67, б, е, кривые 1, 2). Однако уже 2–3-х часовое УФ-облучение семян продолжает стимулировать дальнейшее накопление в них свободных радикалов, что выражается в возрастании в проростках пшеницы в первые три дня как ПОЛ, так и антиоксидантов, после чего эти показатели также синхронно снижаются (рис. 67, б, е, кривые 3, 4).

Воздействие УФ-излучения на семена более 4-х часов (рис. 67, в, г, ж, з) сопровождается активизацией компенсаторных механизмов, что способствует подавлению в первые дни роста проростков пшеницы в них перекисного окисления липидов до уровня 40–60% от контроля, за счет увеличения содержания антиоксидантов на 20–50%. Однако в дальнейшем динамика ПОЛ в проростках начинает приобретать выраженный колебательный характер. Полученные данные полностью согласуются с концепцией Е.Б. Бурлаковой [Бурлакова и др., 1975; Бурлакова, 1976] о взаимосвязанной регуляции свободнорадикального окисления липидов и антиокислительной активности. Поэтому окислительный стресс у растений, вызванный УФ-излучением, также как и у животных, может на первом этапе сопровождаться подавлением ПОЛ за счет имеющихся в растениях антиокислительных ресурсов, что, по-видимому, является стадией срочной адаптации. Однако длительное воздействие стрессирующего фактора может переводить организм из состояния компенсаторно приспособленного, в стадию неустойчивого состояния, с наблюдаемыми резкими перепадами в показателях как перекисного окисления, так и системы антиокислительной защиты, что грозит нарушением регуляторных механизмов и резкому снижению резистентности растительного организма, а при чрезмерно высокой дозе и длительности УФ-излучения к его гибели. Малые дозы УФ-излучения способны активировать прорастание зерновок, однако механизмы этого явления недостаточно изучены. Нами показано, что малые дозы ультрафиолетового излучения могут стимулировать процессы ПОЛ в проростках пшеницы, в ответ на это в них начинает резко возрастать антиоксидантная активность. Таким образом, малые дозы УФ-излучения способны инициировать синтез соединений, обладающих антиоксидантными свойствами среди которых, по-видимому, могут содержаться вещества способные активировать процессы деления клеток, стимулируя в зерновках процессы деления и роста клеток зародыша. К соеди-

нениям такого механизма действия могут относиться стероидные гликозиды, флавоноиды и т.д., исследование природы которых позволит раскрыть активационный механизм малых доз ультрафиолетового излучения.

5.2. РОЛЬ МАЛЫХ ДОЗ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ДИНАМИКУ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Изучена динамика активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), алкогольдегидрогеназы (АДГ) и пероксидазы (ПР) зерновок пшеницы сорта Приленская 19 в течение 24 часов набухания (рис. 68). Показано, что в увеличении активности ферментов отмечается индивидуальная периодичность, зависящая от их природы и места локализации. Аналогичная периодичность в увеличении скорости биосинтеза макромолекул была отмечена на 6–9-м и 14–20-м часах прорастания семян гороха [Калинин, 1986]. Между этими двумя периодами исследователи отмечали снижение интенсивности биосинтеза белка и РНК. Причем изменение скорости процессов синтеза

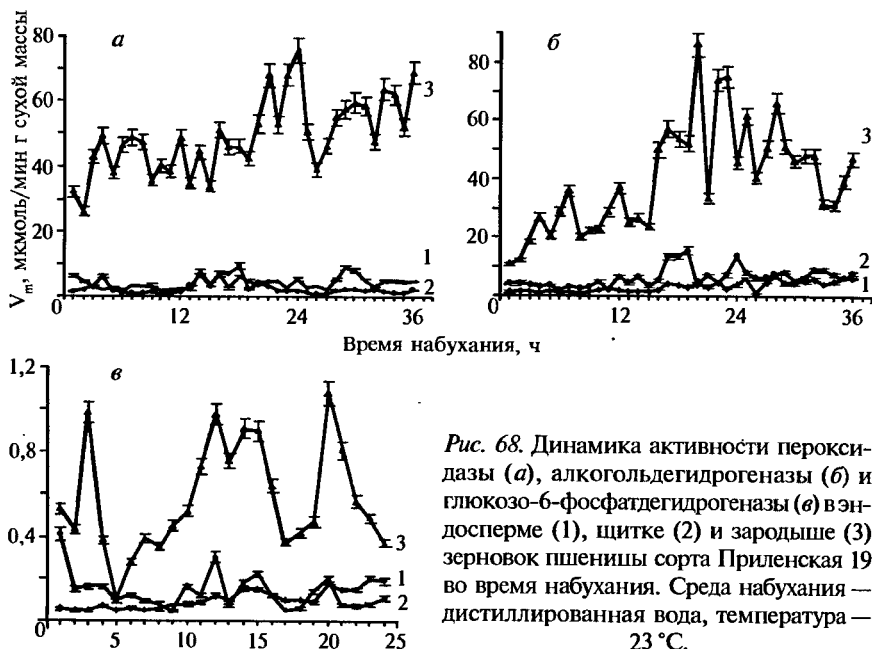


Рис. 68. Динамика активности пероксидазы (а), алкогольдегидрогеназы (б) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (в) в эндосперме (1), щитке (2) и зародыше (3) зерновок пшеницы сорта Приленская 19 во время набухания. Среда набухания — дистиллированная вода, температура — 23 °С.

РНК, белков определялось уровнем содержания предшественников, активностью РНК-полимераз, структурно-функциональным строением хроматина. Активность РНК-полимераз обнаруживалась уже на первом часу набухания семян. В дальнейшем ходе прорастания семян наблюдалось трехфазное изменение активности этих РНК-полимераз, которое коррелирует с трехфазным изменением биосинтеза РНК. Поэтому наблюдаемая нами периодичность активности ферментов, возможно, обусловлена интенсивностью процессов биосинтеза белков, в том числе и ферментов, и активностью протеолитических ферментов, осуществляющих гидролитическое расщепление белков в клетке. Оценки уровня интенсивности этих процессов можно производить с помощью определения величин $V_{\max}$ и $V_{\min}$. Отношение $V_{\max}/V_{\min}$ позволяет судить о возможной максимальной эффективности процесса биосинтеза данного фермента.

Скорость биосинтеза ферментов и протеолиза в течение 24 часов набухания семян пшеницы могут изменяться. Однако сумма максимальных активностей ферментов остается величиной постоянной и может служить характеристической величиной средней продуктивности процесса биосинтеза в течение всего времени набухания. В зерновках пшеницы изменение максимальной активности Г6ФДГ, АДГ и пероксидазы эндосперма, щитка и зародыша коррелирует с величинами средних скоростей их синтеза в этих частях в течение всего времени набухания. Причем наибольшая активность ферментов отмечается в зародыше, а затем по убывающей в щитке и эндосперме. Величины максимальной активности Г6ФДГ, АДГ и пероксидазы в зародыше выше активности ферментов эндосперма в 5, 20, 9,7 раз, а щитка — 3,5, 6, 7,9 раз соответственно. При этом средняя скорость биосинтеза Г6ФДГ, АДГ и пероксидазы в зародыше выше активности этих ферментов в эндосперме в 5,7, 16,5, 12 раз, а щитка — 4, 6,5, 14,8 раз соответственно.

Нами показано, что малые дозы УФ-излучения могут изменять периодичность возрастания активности ферментов со сдвигом экстремумов на более раннее время (рис. 69, 70). Причем максимальная активность АДГ и пероксидазы эндосперма уменьшается на 17–30 и 8–27, щитка — 78–82 и 80–90, зародыша — 75–86 и 70–75 процентов соответственно, при незначительном, всего на 10–25%, снижении активности Г6ФДГ в этих частях зерновок пшеницы. Средняя скорость синтеза АДГ



Рис. 69. Динамика активности пероксидазы (а), алкогольдегидрогеназы (б) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (в) в эндосперме (1), щитке (2) и зародыше (3) зерновок пшеницы сорта Приленская 19 во время набухания после предварительного 5 мин УФ-облучения. Условия те же, что на рис. 68.

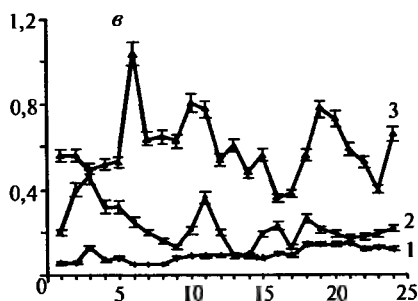


Рис. 70. Динамика активности пероксидазы (а), алкогольдегидрогеназы (б) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (в) в эндосперме (1), щитке (2) и зародыше (3) зерновок пшеницы сорта Приленская 19 во время набухания после предварительного 60 мин УФ-облучения. Условия те же, что на рис. 68.

и пероксидазы зерновок пшеницы, подвергнутых УФ-облучению понижается в зародыше в 3–4, а в щитке — 5–6 раз. В семенах, подвергнутых УФ-излучению, скорость протеолиза возрастает в щитке и зародыше, а в эндосперме, возможно, из-за наличия высокого содержания антиоксидантов, способных ингибировать свободнорадикальные реакции и таким образом предотвращать разрушение лизосом и выход протеаз, протеолиз может несколько понизиться. Возрастание протеолиза в зерновках пшеницы после УФ-облучения семян приводит к понижению активности АДГ и пероксидазы в щитке в 3–7, 2,5–6 и зародыше — 1,3–1,5, 3–5 раз соответственно. Одной из причин увеличения протеолиза в щитке и зародыше, по-видимому, является возрастание концентрации гидролитических ферментов из поврежденных ультрафиолетом лизосом.

Выход из покоя семян обуславливается интенсивностью биосинтетических процессов прежде всего в зародыше и щитке зерновок пшеницы. Снижение этих процессов может приводить к понижению всхожести и энергии прорастания зерновок практически до нуля, что мы наблюдали у зерновок

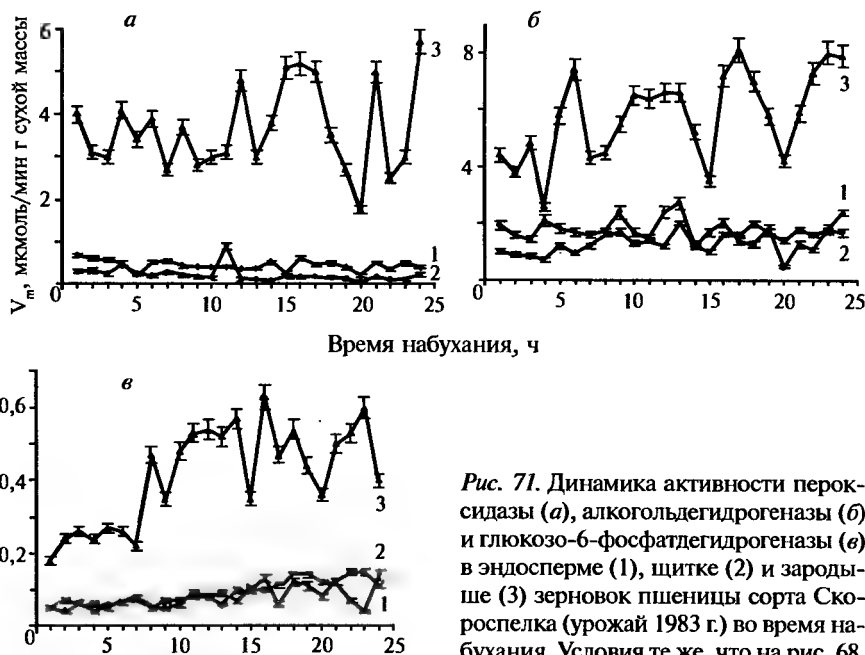


Рис. 71. Динамика активности пероксидазы (а), алкогольдеhydroгеназы (б) и глюкозо-6-фосфатдеhydroгеназы (в) в эндосперме (1), щитке (2) и зародыше (3) зерновок пшеницы сорта Скоропелка (урожай 1983 г.) во время набухания. Условия те же, что на рис. 68.

пшеницы сорта Скороспелка урожая 1983 года (рис. 71), хотя жизнеспособность зерновок пшеницы сохранялась на уровне 56–60%.

Таким образом, малые дозы УФ-излучения, провоцируя свободнорадикальные процессы, могут изменять скорость синтетических процессов в зерновках, ускорять биосинтез ферментов в начальный период набухания, при этом понижая их содержание за счет повышения активности протеаз. Особенно это заметно для мембранных структур, к которым относится щиток. Понижение активности дегидрогеназ и оксидаз в щитке приводит к утрате его функциональной активности, что, возможно, сказывается на его избирательной регуляторной функции и в целом на всхожести зерновок пшеницы.

5.3. ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ СЕМЯН НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРОРАСТАЮЩИХ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Набухание и прорастание семян всегда сопровождается активированием оксидазных процессов [Гумилевская и др., 1997]. УФ-облучение семян может инициировать возрастание ПОЛ, регулируемое в живых организмах компонентами антиоксидантной системы. Однако антиокислительная активность, особенно, в первые часы прорастания зерновок пшеницы не изучена. При этом известно, что прорастание семян сопровождается высоким потреблением кислорода, активные формы которого участвуют в процессах пролиферации клеток [Обручева, Антипова, 1999], регенерации тканей [Вартанян и др., 1992], развитии иммунитета растений [Лукаткин и др., 1995].

Поэтому мы исследовали влияние малых доз ультрафиолетового облучения семян на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительную активность во время набухания и проклевывания семян пшеницы. Изучили роль антиоксидантной системы в регулировании ПОЛ в первые сутки прорастания семян [Рогожин и др., 1997; Рогожин, Курилюк, 1999].

Ультрафиолетовое излучение активирует перекисное окисление липидов [Рощупкин, Мурина, 1993]. Облучение семян пшеницы УФ светом повышает в них уровень ПОЛ и содержание ан-

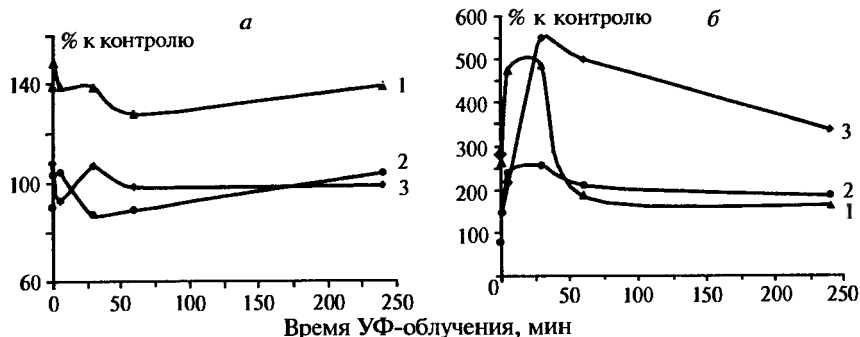


Рис. 72. Влияние УФ-облучения на содержание антиоксидантов (а) и малонового диальдегида (б) в эндосперме (1), щитке (2) и зародыше (3) зерновок пшеницы сорта Приленская 19. Время замачивания зерновок 24 часа в дистиллированной воде при 22 °С.

тиоксидантов (рис. 72). Особенно это проявляется в течение первых 30 минут. Резкое увеличение ПОЛ отмечено в зародыше семян в 5,5 раза, эндосперме — в 4,9 раза, щитке — в 2,5 раза. При этом антиокислительная активность повышалась в эндосперме в 1,5 раза, а в зародыше и щитке на 5–8%. Продолжительное действие УФ-излучения, по-видимому, за счет активизации компенсаторных механизмов, проявляющихся в повышении содержания антиоксидантов, способствует понижению уровня ПОЛ. Таким образом, во время замачивания, после предварительного УФ-облучения семян пшеницы, наибольшая реактивность антиоксидантной системы проявляется после 24 часов в эндосперме, что, возможно, связано с ускорением в эндосперме гидролитических процессов, способствующих высвобождению резервированных функционально активных веществ среди которых могут быть и соединения обладающие антиоксидантными свойствами. В этот период в зародыше и щитке не наблюдается дополнительного повышения активности антиоксидантной системы, что, по-видимому, вызвано использованием компонентов АО в энергетических процессах, для роста и развития зародыша семян пшеницы. Окисление антиоксидантов осуществляется пероксидазой, активность которой резко возрастает при прорастании семян пшеницы [Иванова, Вафина, 1997].

Изучена динамика содержания антиоксидантов и ПОЛ в зародыше семян пшеницы во время 48 ч набухания в дистиллированной воде. Из рис. 73 видно, что во время набухания содержание АО и уровень ПОЛ колеблются, возрастая на 18 и 30 ч, а затем



Рис. 73. Динамика содержания антиоксидантов (1) и малонового диальдегида (2) в зародыше зерновок пшеницы сорта Приленская 19 от времени замачивания. Времена замачивания зерновок 48 ч в дистиллированной воде при 25 °С.

наблюдаются различия в динамике, вызванные продолжающимися условиями анабиоза, приводящими к понижению интенсивности дыхания. При этом уровень ПОЛ понижается, а содержание антиоксидантов увеличивается в семенах, что, по-видимому, является проявлением биохимических механизмов углубления покоя зерновок пшеницы.

Аналогичная динамика ПОЛ и антиоксидантов выявлена в щитке семян пшеницы в процессе их набухания. Щиток выполняет важную роль в процессах набухания и прорастания семян пшеницы. Основная функция которого заключается в осуществлении связи между эндоспермом и всеми структурами зародыша, поскольку в щитке дифференцируется проводящая система. За счет специализированного эпителиального слоя щитка, в котором имеется большое количество ферментов, происходят структурные преобразования веществ, поступающих из эндосперма в зародыш, а в дальнейшем и в проросток [Батыгина, 1987].

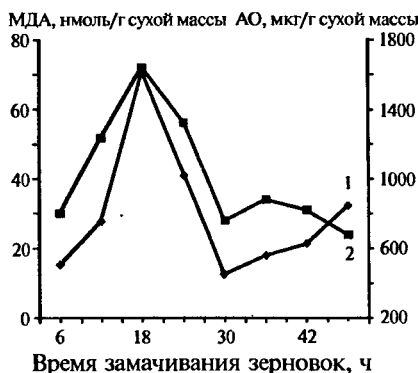


Рис. 74. Динамика содержания антиоксидантов (1) и малонового диальдегида (2) в щитке зерновок пшеницы сорта Приленская 19 от времени замачивания. Условия те же, что на рис. 73.

Показано, что уровень ПОЛ и активность антиоксидантной системы щитка находятся в прямой зависимости (рис. 74) ($r = 0,84$). Максимум проявления их действия приходится на 18 ч набухания семян с постепенным снижением к концу вторых суток. При этом в щитке возрастание антиокислительной активности всегда отмечается вслед за увеличением уровня ПОЛ. По-видимому, во время набухания в семенах срабатывает внутренний контроль за уровнем

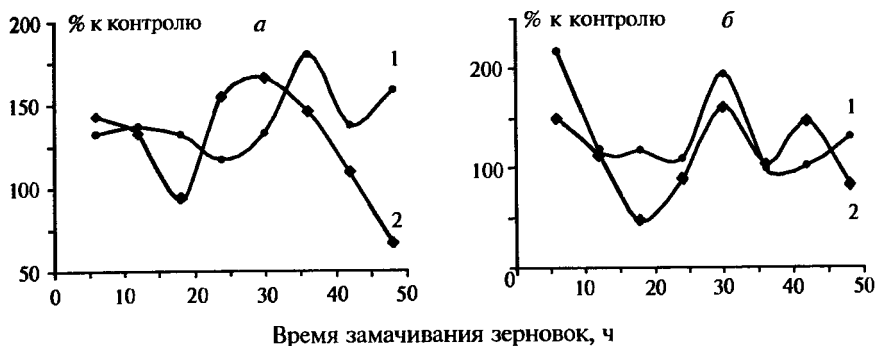


Рис. 75. Влияние УФ-облучения на содержание малонового диальдегида (1) антиоксидантов (2) в щитке зерновок пшеницы сорта Приленская 19. Время УФ-облучения зерновок, мин: а — 5, б — 60. Условия те же, что на рис. 73.

нем ПОЛ и при его понижении, что наблюдалось на вторые сутки замачивания семян в условиях искусственного анабиоза, отмечалось даже некоторое возрастание АОА в щитке. УФ-облучение семян пшеницы активирует ПОЛ и систему АОА в щитке (рис. 75). Видно, что в зависимости от времени УФ-облучения поведение антиоксидантной системы может меняться. Непродолжительное, в течение 5 мин, УФ-облучение позволяет активировать компенсаторные механизмы настолько, что антиокислительная активность щитка может подавлять ПОЛ в течение полутора суток. Однако в дальнейшем АОА щитка резко понижается, что способствует возрастанию ПОЛ. Продолжительное действие УФ-облучения на семена позволяет синхронизировать активность антиоксидантной системы щитка с уровнем ПОЛ. При этом на возрастание уровня ПОЛ в щитке вырабатывается достаточное количество антиоксидантов, чтобы поддерживать перекисное окисление липидов на уровне контроля. Вследствие этого графики содержания МДА и АО в течение двух суток принимают вид затухающих колебаний с максимумами к 30 ч набухания.

Известно, что низкая температура понижает скорость прорастания семян. В непроросших семенах пшеницы уровень ПОЛ и АО ниже, чем в проросших семенах. Сравнивая значения содержания МДА и АО, приведенные в таблице 20, видно, что у непроросших семян и семян пшеницы, выдержанных при 5 °С, эти показатели мало различаются. Таким образом, низкий уровень ПОЛ служит критерием проявлением малой активности АФК, при этом по величине ПОЛ можно определять жизнеспособность зерно-

Таблица 20

Содержание малонового диальдегида (нмоль/г сухой массы) и антиоксидантов (мкг/г сухой массы) в непроросших семенах пшеницы сорта Приленская 19 в зависимости от времени и температуры проращивания

Время прорастания зерен, сут.	Температура, °С			
	5		20	
	МДА	АО	МДА	АО
1	24 ± 1	105 ± 7	42 ± 2	90 ± 5
2	27 ± 1	102 ± 6	24 ± 1	78 ± 4
3	29 ± 1	76 ± 4	29 ± 2	36 ± 1
4	23 ± 2	100 ± 5	30 ± 1	93 ± 5
5	32 ± 2	62 ± 4	27 ± 1	20 ± 1
6	29 ± 1	62 ± 3	35 ± 1	95 ± 6
7	26 ± 1	55 ± 4	29 ± 1	96 ± 5

вок пшеницы. Семена с высоким уровнем ПОЛ и низким содержанием АО всегда будут хорошо всходить и быстро прорасть.

После 24 ч набухания при 20 °С семена пшеницы начинают активно прорасть, что проявляется в активизации процессов пролиферации, завершающихся через 16–24 ч формированием проростка пшеницы. Нами изучено содержание малонового диальдегида



Рис. 76. Динамика содержания малонового диальдегида (1) и антиоксидантов (2) в зерновках пшеницы сорта Приленская 19 в течение первых суток проращивания. Время замачивания зерновок 24 ч, среда замачивания и проращивания — дистиллированная вода; температура — 22 °С.

и антиоксидантов в прорастающих семенах пшеницы после 24 ч замачивания в дистиллированной воде (рис. 76). Видно, что в процессе прорастания антиоксидантная система зерновок полностью контролирует уровень ПОЛ. Возрастание ПОЛ отмечается на 10 и 24 ч прорастания зерновок и связано с увеличением АОА ($r = 0,79$). УФ-облучение вызывает в прорастающих семенах пшеницы колебания ПОЛ и АОА, интенсивность которых зависит от времени воздействия (рис. 77). Динамика ПОЛ в проростках уже после минутного УФ-облучения зерновок пшеницы принимает выраженный колебательный ха-

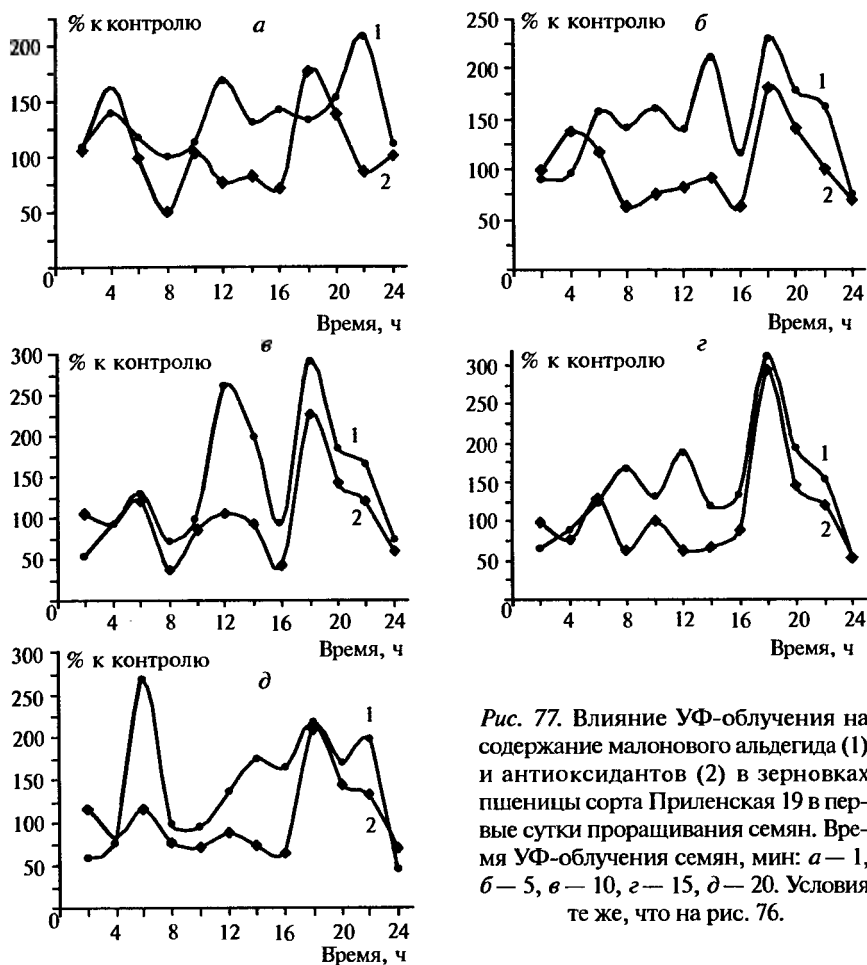


Рис. 77. Влияние УФ-облучения на содержание малонового альдегида (1) и антиоксидантов (2) в зерновках пшеницы сорта Приленская 19 в первые сутки прорастивания семян. Время УФ-облучения семян, мин: а — 1, б — 5, в — 10, г — 15, д — 20. Условия те же, что на рис. 76.

раक्टर с возрастанием на 4, 12 и 22 ч ($r = 0,5$). При этом АОА в первые часы прорастания зерновок понижалась, а затем к 18 ч повысилась. После 5 мин УФ-облучения в прорастающих семенах активность антиоксидантной системы в начале прорастания уменьшается, но к 18 ч возрастает в 1,5–1,8 раз ($r = 0,5$). Ультрафиолетовое облучение зерновок в течение 10, 15 и 20 мин вызывает одновременное увеличение к 6, 12 и 18 ч как уровня ПОЛ, так и антиоксидантов ($r = 0,5–0,92$). Повышение ПОЛ в прорастающих семенах всегда, независимо от времени УФ-облучения, находится под контролем антиоксидантной системы, влияние которой проявляется на 16–20 ч прорастания зерновок пшеницы

повышением уровня антиоксидантов в 3—5 раз. Однако при продолжительном УФ-облучении в семенах вырабатываются компенсаторные механизмы, противодействующие образованию свободных радикалов в прорастающих семенах пшеницы, использующих кроме антиоксидантов еще, возможно, и другие механизмы подавления ПОЛ, поскольку после 15—20 мин УФ-облучения в прорастающих семенах содержание малонового диальдегида может понижаться, несмотря на то, что АОА в них может быть даже ниже контрольного уровня.

Таким образом, на основании полученных данных можно высказать предположение, что контроль за уровнем ПОЛ во время набухания и прорастания зерновок пшеницы, осуществляется с помощью низкомолекулярных антиоксидантов, содержание которых связано с уровнем ПОЛ в зерновках. После УФ-облучения в семенах возрастает уровень ПОЛ. Понижение свободнорадикальных процессов в семенах возможно за счет синтеза большого количества антиоксидантов, концентрация которых при этом возрастает в несколько раз, особенно в зародыше зерновок пшеницы. Т.е. отмечается активация АОС в ответ на УФ облучение, проявляемая суперпродукцией антиоксидантов.

Выявленные закономерности, по-видимому, являются проявлением адаптационных компенсаторных механизмов, использование которых позволяет регулировать состояние покоя зерновок. Уменьшение содержания антиоксидантов обеспечивает быстрый выход зерновок из состояния покоя, тогда как накопление антиоксидантов способствует углублению гипобиотического состояния зерновок пшеницы.

5.4. ВЛИЯНИЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ ЗЕРНОВОК НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Набухание зерновок обычно сопровождается активацией аэробных метаболических процессов, делением клеток, расходом, имеющегося пластического материала. Поступление кислорода приводит к возрастанию процессов перекисного окисления липидов, генерации свободных радикалов. В литературе накоплено много фактов о влиянии УФ-излучения на всхожесть зерновок. Причем известно, что малые дозы ультрафиолетового излучения обычно повышают всхожесть зерновок, тогда как вы-

сокие дозы могут подавлять прорастание проростков. Однако мало изученным является вопрос о динамике ПОЛ и антиоксидантов в течение первых 7–8-и дней прорастания зерновок, подвергнутых предварительно УФ-излучению. УФ-облучение семян пшеницы сорта Скороспелка в первых 0,5–1 час вызывает понижение всхожести и энергии прорастания, а затем некоторое возрастание. Дальнейшее воздействие УФ-излучения в течение 5–10 часов приводит к понижению всхожести и энергии прорастания зерновок до 70–72% (рис. 78). Однако понижение всхожести зерновок пшеницы

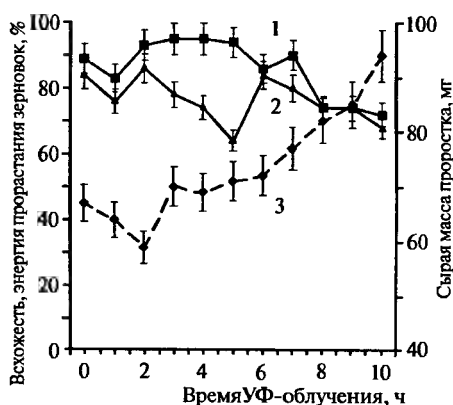


Рис. 78. Влияние УФ-облучения зерновок пшеницы сорта Скороспелка на всхожесть (1), энергию прорастания (2) и сырую массу проростка (3).

Таблица 21

Влияние УФ-облучения семян на содержание малонового диальдегида в проростках пшеницы сорта Скороспелка улучшенная

Время УФ-облучения, мин	Содержание МДА, нмоль/г сухой массы						
	время проращивания, сут						
	1	2	3	4	5	6	8
Контроль	55	107	160	140	358	335	315
1	40	93	157	137	315	—	—
5	37	97	154	116	312	—	—
10	30	94	152	110	309	—	—
15	24	93	149	105	294	—	—
20	25	108	149	139	267	—	—
30	53	116	133	124	336	322	268
60	57	127	82	63	308	335	268
120	97	119	119	67	336	362	288
180	100	159	155	76	320	435	315
240	60	127	162	94	313	435	268
300	22	78	244	108	308	482	281
360	30	73	106	130	302	456	248
420	22	130	208	180	401	409	248
480	32	113	244	175	291	415	275
540	55	157	221	153	358	295	248
600	42	94	95	194	401	241	288

в этот период может сопровождаться возрастанием массы одного проростка на 20–30% (рис. 78, кривая 3). Таким образом видно, что УФ-облучение зерновок пшеницы может оказывать влияние на рост и развитие проростков пшеницы. Поэтому нами изучена динамика уровня ПОЛ и антиоксидантная активность в этих проростках пшеницы (табл. 21, 22). Формирование проростков пшеницы сопровождается возрастанием антиоксидантной активности (табл. 22), что, возможно, является ответной реакцией со стороны функциональных систем.

УФ-излучение может служить провоцирующим фактором свободно-радикальных процессов в растительных организмах, интенсивность которых зависит от содержания антиоксидантов. Следует отметить, что различные дозы УФ-облучения могут приводить к возникновению колебательной динамики в содержании антиоксидантов в проростках пшеницы в процессе их роста (табл. 23). Малые дозы УФ-излучения стимулируют процессы антиоксидантной защиты, увеличивая содержание антиоксидантов, что проявляется на протяжении восьми дней проращивания

Таблица 22

**Влияние УФ-облучения семян на содержание антиоксидантов
в проростках пшеницы сорта Скороспелка улучшенная**

Время УФ-облучения, мин	Содержание антиоксидантов, мг/г сухой массы					
	время проращивания, сут					
	1	2	3	4	5	8
Контроль	23	28	25	41	31	48
1	22	29	29	43	33	—
5	27	34	36	47	35	—
10	26	38	36	50	31	—
15	27	38	39	52	35	—
20	27	38	17	51	33	—
30	24	35	34	50	48	53
60	34	28	15	28	29	53
120	36	32	16	23	32	54
180	30	30	14	25	25	51
240	30	31	17	26	32	54
300	27	34	21	26	32	42
360	32	31	18	30	47	56
420	34	31	19	26	41	53
480	27	36	19	34	32	56
540	30	29	22	29	36	60
600	26	34	13	29	37	55

Таблица 23

Динамика активности пероксидазы в различных органах пшеницы сорта Скороспелка улучшенная от времени УФ-облучения семян

Органы растения	Время проращивания, сут	Активность пероксидазы, мкмоль/мин г сухой массы						
		контроль	время УФ-облучения семян пшеницы, мин					
			1	5	10	15	20	30
Зерно	1	6,5	5,2	6,0	3,4	4,7	6,0	7,1
	2	8,5	6,7	5,2	9,0	7,5	6,0	4,1
Эндосперм	3	4,5	4,8	3,9	3,7	3,1	1,9	2,5
	4	7,5	6,8	9,7	4,0	6,7	9,0	6,5
	5	6,8	13,1	10,0	10,0	15,0	8,7	10,0
	6	8,7	15,0	13,7	10,0	13,7	7,5	10,0
	7	8,7	6,1	4,2	8,7	8,7	9,3	6,5
Проростки	3	2,8	2,2	3,0	3,4	1,8	1,4	1,5
	4	6,0	4,5	5,0	7,5	9,0	5,6	6,5
	5	6,8	5,0	4,4	5,0	4,4	4,4	4,5
	6	5,6	6,2	3,7	5,1	6,2	6,2	5,0
	7	5,1	3,7	5,0	5,0	4,2	5,6	5,1
Корни	2	8,2	9,7	7,0	9,0	5,2	5,5	4,0
	3	12,1	15,7	18,7	9,3	5,0	6,2	6,1
	4	12,5	16,2	20,6	18,2	15,0	12,5	6,8
	5	13,5	13,5	18,0	13,5	11,2	11,2	12,0
	6	18,0	13,5	15,0	13,5	19,5	13,5	10,5
	7	16,2	15,0	12,0	18,0	15,7	16,5	10,5

проростков пшеницы, в течение которых были проведены исследования (табл. 22). За счет высоко активной системы антиоксидантной защиты подавляются свободнорадикальные процессы, понижается уровень ПОЛ (рис. 79). Однако этот период продолжается только при УФ-облучении зерновок пшеницы в течение 30–60 минут. Более продолжительное действие УФ-излучения на семена пшеницы, по-видимому, приводит к понижению реактивности проростков пшеницы, уменьшению содержания в них антиоксидантов, последствием которого является возрастание уровня ПОЛ при продолжительности воздействия УФ-излучения на семена пшеницы в течение 1–6-ти часов за счет наличия имеющихся компенсаторных механизмов в проростках. Это позволяет им адаптироваться к воздействию фактору, постепенно увеличивая антиоксидантную активность, реализуя имеющиеся резервные возможности, что проявляется после 5–6-ти часов УФ-облучения зерновок пшеницы. Наиболее выраженная колебательная динамика уровня ПОЛ и антиоксидантов проявляется в

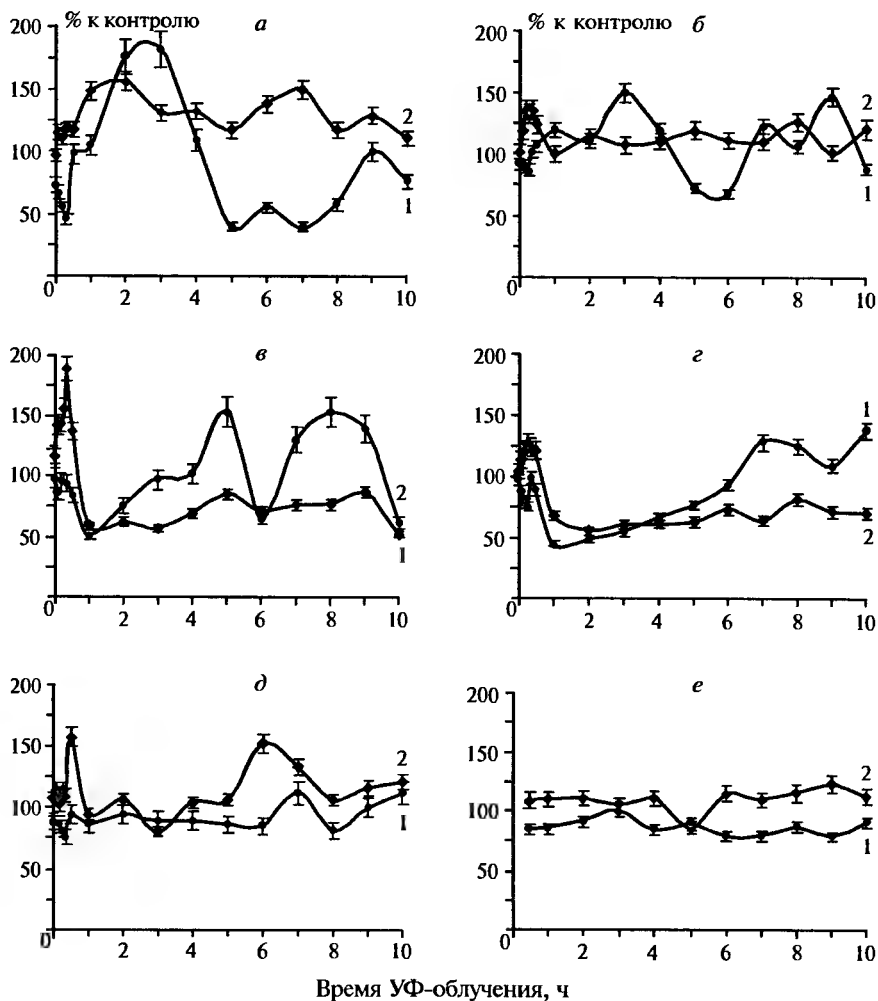


Рис. 79. Влияние УФ-облучения семян на содержание малонового диальдегида (1) и антиоксидантов (2) в зеленых проростках пшеницы сорта Скороспелка. Условия выращивания: температура — 23 °С, время УФ-облучения семян 1–600 мин; время проращивания проростков пшеницы, дни: а — 1; б — 2; в — 3; г — 4; д — 5; е — 8.

первые 3–4-е дня прорастания проростков пшеницы, при этом уровень ПОЛ и содержание антиоксидантов может изменяться в пределах 40–180% к контролю (рис. 79, а, б, в, г). К пятому дню проращивания зерновок пшеницы корни и зеленый проросток имеют достаточные размеры, что позволяет определять в них уровень ПОЛ и антиокислительную активность (рис. 79, д). Нами

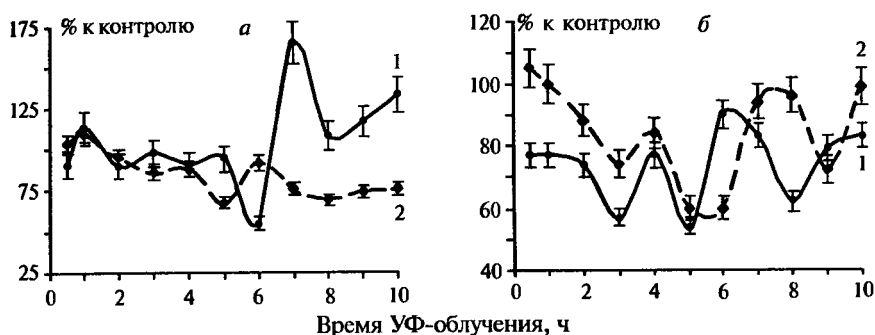


Рис. 80. Влияние УФ-облучения зерновок пшеницы сорта Скороспелка на содержание малонового диальдегида (1) и антиоксидантов (2) в пятидневных проростках пшеницы: а — побеги, б — корни.

изучено содержание МДА и антиоксидантов в пятидневных проростках пшеницы (рис. 80). Показано, что антиоксидантов содержится в зеленых проростках в 2–2,5 раза больше, чем в корнях проростков. Однако уровень ПОЛ в корнях в 5,6–9,5 раз ниже, чем в зеленых проростках. Таким образом антиокислительная активность корней в 2,5–5,0 раз выше зеленых проростков. Установлено, что после пяти часов УФ-облучения зерновок пшеницы в зеленых проростках и корнях понижается уровень ПОЛ и антиоксидантная активность. При этом более продолжительное УФ-излучение в течение 6–10-ти часов, приводит к тому, что в зеленых проростках антиокислительная активность продолжает понижаться, вследствие этого ПОЛ резко возрастает (рис. 80, а), а в корнях проростков антиокислительная активность наоборот увеличивается при понижении уровня ПОЛ (рис. 80, б).

В системе антиоксидантной защиты растений участвуют несколько ферментов, среди которых следует выделить пероксидазу. Поэтому нами изучена динамика активности пероксидазы в эндосперме, корнях и зеленых проростках пшеницы, семена которых были подвергнуты УФ-облучению в течение 30 минут (рис. 81): Активность пероксидазы в эндосперме, корнях и зеленых проростках имеет специфичную динамику. Малые дозы УФ излучения в течение 5–15 минут вызвали возрастание активности фермента в эндосперме на 5–6-ой, в корнях — 3–4-ый, а в зеленых проростках на 4-ый и 6-ой день прорастания.

Известно, что ультрафиолетовое излучение активирует образование свободных радикалов, увеличивает скорость перекисного окисления липидов, которые могут вызывать повреждение



Рис. 81. Влияние УФ-облучения зерновок пшеницы сорта Скороспелка на динамику активности пероксидазы эндосперма (а), зеленых частей (б) и корней (в) проростков пшеницы. Время УФ-облучения, мин: 1 — 1; 2 — 5; 3 — 10; 4 — 15; 5 — 20; 6 — 30.

структуры клеточных мембран, ДНК, модифицировать белки (рис. 82). В ответ на действие УФ-излучения организм отвечает активированием систем неспецифической защиты компонентами которой, в основном, являются антиоксиданты (аскорбиновая кислота, токоферолы, флавоноиды и т.д.) и оксидазные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и др.). Реактивность и устойчивость любой биологической системы на действие УФ-излучения зависит от интенсивности и продолжительности действия разрушающего фактора. Расходуя имеющиеся пластические и энергетические ресурсы, биологическая система в ответ на воздействие способна находиться в различных адаптационных состояниях (стадии срочной и долговременной адаптации). В начальный период времени, когда имеются еще значительные резервы пластического материала система способна активировать анаболические процессы, повышая уровень антиоксидантной активности и за счет этого подавлять перекисное окисление липидов. На этой стадии реализуются быстрые компенсаторные механизмы, проявляющиеся при УФ-облучении зерновок пшеницы в течение 30–60 минут. При этом отмечается резкое возрастание антиокислительной активности

и снижение уровня ПОЛ. Продолжение УФ-облучение зерновок пшеницы в течение 1–4-х часов приводит к перепадам в уровне ПОЛ и антиокислительной активности в проростках. В этот период система, исчерпав запас пластических ресурсов, пытается компенсировать их расход за счет единовременной мобилизации своих метаболических процессов, что выражается в неритмичности проявления антиоксидантной активности. Более продолжительное действие УФ-излучения на семена пшеницы от 5 до 10-ти часов приводит к возрастанию антиокислительной



Рис. 82. Факторы инициации свободных радикалов в биологических системах и проявляемый эффект их действия под контролем основных компонентов антиоксидантной системы.

активности и понижению уровня ПОЛ, что, возможно, связано с реализацией в этот период механизмов длительной адаптации. Однако в этот период из покоя могут выходить только семена пшеницы с высоким запасом пластических веществ и антиоксидантов, среди которых могут содержаться вещества, способные подавлять свободнорадикальные процессы, стимулировать деление клеток и активировать проницаемость мембран, например, к таким соединениям относятся стероидные гликозиды. Поэтому только семена пшеницы с высоким содержанием антиоксидантов даже после продолжительного действия УФ-излучения могут активно выходить из состояния покоя и иметь большую вегетативную массу.

Высокие дозы УФ-излучения инициируют образование свободных радикалов в клетках, на подавление которых расходуется значительное количество пластического материала растений. Особенно острый дефицит в антиоксидантах ощущается в зеленых проростках, которые вследствие активизации в них свободнорадикальных процессов вынуждены значительную часть синтезируемых соединений расходовать на подавление ПОЛ.

Таким образом, реализация компенсаторных механизмов в семенах пшеницы, подвергшихся УФ-облучению, зависит от активности системы антиоксидантной защиты. Кратковременное воздействие УФ-излучения активирует компенсаторные механизмы за счет которых в семенах происходит ускоренный синтез функционально активных веществ, в частности, стероидных гликозидов, которые могут выполнять функции антиоксидантов и одновременно активировать процессы роста и деления клеток, способствуя выходу зерновок из покоя, что проявляется в повышении всхожести зерновок. Зато продолжительное действие УФ-излучения может углублять покой зерновок, понижая их энергию прорастания и всхожесть, что, возможно, связано со значительным расходом пластического материала на активирование компенсаторных механизмов и, в частности, системы антиоксидантной защиты. Однако у зерновок пшеницы с высоким уровнем активности антиоксидантной защиты ускорение синтеза функционально активных веществ способствует возрастанию уровня метаболических процессов, увеличению вегетативной массы проростков, повышению энергии прорастания и всхожести зерновок.

5.5. ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ПРОРАСТАНИИ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Предполагается, что ведущими в механизме термоадаптации живых организмов являются системы внутриклеточной регуляции, прежде всего генетическая и ферментатическая, функциональная лабильность которых обусловлена их полиморфизмом. Реакция организма на воздействие низкой температуры зависит от силы и продолжительности действия стрессирующего фактора. Величины адаптационных температур могут индуцировать температурнозависимую перестройку генома, приводящую к закаливанию растений, обеспечивающую реализацию максимально возможной потенциальной устойчивости растительного организма. При повреждающих температурах генетически контролируемые перестройки метаболизма затруднены, метаболические превращения выходят из под контроля генома, обратимые изменения переходят в необратимые, при этом происходят структурные и функциональные нарушения [Титов, 1978; Рогожин и др., 1999].

Природа формирования механизмов холодостойкости растений разнообразна и может выражаться в повышении активности водорастворимых белков за счет увеличения их общей концентрации и концентрации активных при низкой температуре ферментов, поддержании мембранных липидов в жидком состоянии путем ингибирования процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), возрастании уровня ненасыщенных липидов, увеличении содержания фосфолипидов [Levitt, 1980]. Ответной реакцией организма на воздействия низкой температуры следует считать влияние на степень сродства фермента к субстрату [Клячко и др., 1993], а также синтез новых изоформ некоторых ферментов [Петрова, Мишустина, 1976]. Выявлена положительная коррелятивная зависимость между морозостойкостью растений и активностью ферментов пероксидазы и о-дифенолоксидазы [Негру, Медведева, 1990; Негру и др., 1988; Рудышин, 1983].

При понижении температуры изменяются физические свойства липидного бислоя мембран: мембрана сжимается, существенно уменьшается ее площадь, увеличивается толщина, снижается гидрофобное взаимодействие и усиливается электростатическое. Все это приводит к высвобождению периферических мембранных белков из мембраны, изменению структуры интегральных

белков, что наряду с прямым влиянием низкой температуры на структуру белков существенно модифицирует их ферментативные свойства [Effects..., 1981]. При продолжительном воздействии низких температур в растении происходит однородное сжатие и затвердевание липидного бислоя клеточных мембран, что приводит к снижению проницаемости мембран для воды и к превышению потерь воды над поглощением ее в корнях, к росту энергии активации мембранных ферментов в хлоропластах и митохондриях, к ингибированию фотосинтеза, дыхания и к метаболической коме [Levitt, 1980]. Кратковременная повторяющаяся гипотермия активно индуцирует синтез стрессовых белков [Войников, Кoryтов, 1993]. Однако природа новых стресс белков изучена недостаточно. Изменения в составе белков при кратковременном температурном воздействии представляет интерес в связи с поиском белков-маркеров, необходимых для селекции растений на морозоустойчивость [Мишарин и др., 1997]. Приобретение растениями свойств повышающих их холодо- и морозостойкости связано с изменением в клетках состава веществ: крахмала, фруктозанов, сахарозы, органических и нуклеиновых кислот, аминокислот, растворимых фенолов, тиолов, гидролизуемых танинов, липидов, белков (ферментов), АТФ, НАДФ и др. [Levitt, 1980; Temperature ..., 1973; Климов, 1997]. В работах [Туманов, 1979; Дроздов и др., 1984; Войников, 1988] высказано предположение, что реакция растений на изменения температуры обусловлена способностью приспосабливать направленность биохимических процессов к новым условиям среды, приводящих к нарушению нормального обмена веществ в клетках. При этом гибель растений может наступать задолго до физических изменений цитоплазмы, связанных с образованием льда.

Известно, что при неблагоприятных условиях существования в растениях резко возрастает содержание этилена, абсцизовой кислоты и других функционально активных соединений, снижающих обмен веществ, увеличивающих устойчивость растений к повреждениям, тормозящих ростовые процессы, способствующие старению и переходу растительного организма в состояние покоя [Пахомова, 1995]. Проявлением ответной реакции на действие стрессирующих факторов в живых организмах является резкое активирование свободнорадикальных реакций в клетке в начальный период стресса [Пахомова, Чернов, 1996]. Антиоксиданты способны связывать свободные радикалы, которые способствуют разви-

тию деструктивных окислительных процессов, усиливающих при воздействии на клетку повреждающих физических и химических факторов различной природы. Накопление антиоксидантов способствует ингибированию деструктивных реакций свободно-радикального окисления [Колупаев, Трунова, 1992]. Поэтому мы исследовали проявления компенсаторных механизмов антиоксидантной системы зерновок и проростков пшеницы на действие низких положительных температур и УФ излучения.

Наличие высокой активности пероксидазы в семенах и проростках пшеницы позволяет предположить участие фермента в метаболических процессах, происходящих во время покоя зерновок и в период их активного прорастания. Пероксидаза входит в состав антиоксидантной системы, активность которой определяет их уровень устойчивости к различным воздействующим факторам в процессе онтогенеза растений. Фермент способен катализировать окисление различных неорганических и органических соединений. Обладая широкой субстратной специфичностью фермент может проявлять свойства оксидазы. Поэтому активность пероксидазы возрастает с увеличением дыхания семян при выходе их из состояния вынужденного покоя. Сродство пероксидазы к различным соединениям, являющимися субстратами фермента, может характеризоваться величинами констант Михаэлиса-Ментен (K_m) и каталитической константой (k_{cat}). В случае использования неочищенного фермента, когда неизвестна его концентрация характеристической величиной может быть V_m , рассчитанная на грамм сухой массы. Субстраты пероксидазы можно условно разделить, как это было описано выше, на две группы: быстро окисляемые и медленно окисляемые. При совместном присутствии субстраты могут окисляться последовательно, при этом быстро окисляемый субстрат активирует окисление медленно окисляемого субстрата [Лебедева, Угарова, 1996; Рогожин, Верхотуров, 1998а], причем в условиях *in vivo* преимущественно протекает совместное окисление субстратов в присутствии пероксидазы.

Нами изучена активность пероксидазы и содержание АО в семенах пшеницы в течение 24 часов набухания при 5° (I группа) и 23 °С (II группа). Видно, что процесс набухания зерновок сопровождается возрастанием активности фермента (рис. 83). Активность пероксидазы и содержание АО в зародыше у зерновок I группы было выше в 1,5 раза. У этих же зерновок в процессе набухания



Рис. 83. Активность пероксидазы зерен пшеницы сорта Омская 12 в зависимости от времени набухания при 5° (1) и 23°С (2).

фирмой «Reanal», тогда как K_m по АК в 5–9 раз ниже показателей очищенного препарата. Такие различия можно объяснить за счет присутствия в гомогенате зерновок посторонних субстратов пероксидазы, участвующих в совместном окислении аскорбиновой кислоты [Рогожин, Верхотуров, 1998а].

Активность пероксидазы в проростках пшеницы, семена которых замачивали при 5° и 23°С, проявлялась в своеобразной дина-

повышается активность пероксидазы в эндосперме и кожуре в 1,5 и 1,8 раза соответственно (табл. 24).

Определены величины каталитических констант пероксидазы зерновок пшеницы в реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизидина и аскорбиновой кислоты (табл. 25). Показано, что K_m мало изменяется в исследованном диапазоне pH 5–7. K_m по *o*-дианизидину незначительно отличается от константы Михаэлиса, определенной для очищенного препарата пероксидазы хрена выпускаемой

Таблица 24

Биохимические показатели органов семян пшеницы сорта Омская 12 после 24 ч замачивания в дистиллированной воде при разных температурах

Орган	ПО мкмоль/г сухой массы		ПОЛ нмоль/ г сухой массы		АО мкг/г сухой массы	
	температура, °C					
	5	23	5	23	5	23
Сухое зерно	3,70 ± ± 0,21	3,60 ± ± 0,25	25,3 ± ± 1,8	21,8 ± ± 1,1	85,2 ± ± 3,2	88,3 ± ± 3,8
Кожура семени	0,44 ± ± 0,03	0,25 ± ± 0,02	23,4 ± ± 1,5	25,5 ± ± 1,6	160,7 ± ± 12,1	176,2 ± ± 13,4
Эндосперм	0,42 ± ± 0,03	0,28 ± ± 0,03	19,6 ± ± 1,2	20,7 ± ± 1,3	133,3 ± ± 6,5	124,3 ± ± 11,3
Щиток	22,2 ± ± 0,12	21,7 ± ± 0,11	—	—	256,4 ± ± 15,2	256,4 ± ± 18,8
Зародыш	59,3 ± ± 0,45	39,0 ± ± 0,32	95,3 ± ± 5,4	117,4 ± ± 8,5	398,4 ± ± 24,7	285,7 ± ± 21,5

мике и зависела от природы исследуемых частей пшеницы (зерно, надземная часть или корни) (рис. 84). Отмечался линейный рост активности пероксидазы в зерне с небольшим опережением у зерновок II группы (рис. 84, а). Зависимости активности пероксидазы надземной части проростков пшеницы имели вид «качелей» с постепенным снижением в первые 3–4 дня, а затем повышением к 7-му дню прорастания проростков (рис. 84, б). Причем более высокие показатели активности пероксидазы были у зерновок II группы. Своеобразная динамика проявлялась в активности пероксидазы корней (рис. 84, в). В корнях зерновок II группы в первые 2–3 дня понижалась активность пероксидазы и только на 7-ой день отмечался рост. Зависимость активности пероксидазы у корней зерновок I группы активностью пероксидазы принимала вид затухающих колебаний с возрастанием активности на 3-й и 6-й день, с понижением к седьмому дню прорастания корней до нормы. Причем активность пероксидазы в корнях зерновок I группы была в 1,5–2,5 раза выше, чем у корней зерновок II группы.

Нами отдельными экспериментами было показано отсутствие в супернатанте активаторов и ингибиторов пероксидазы. Поэтому мотивацией к повышению активности пероксидазы

Таблица 25
Величины K_m (мкМ) реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина (ОДН) и аскорбиновой кислоты (АК), катализируемых пероксидазой зерен и 7-ми суточных проростков (надземная часть и корни) пшеницы сорта Омская 12

рН	Сухое зерно		Проростки пшеницы								Корни хрена**	
			надземная часть				корни					
	ОДН	АК	ОДН*	ОДН	АК	ОДН*	АК*	ОДН	АК	ОДН	АК	
5,0	54 ± 2	38 ± 2	62 ± 2	94 ± 3	263 ± 12	22 ± 1	70 ± 2	62 ± 2	33 ± 2	40 ± 2	340 ± 18	
5,5	59 ± 3	35 ± 2	137 ± 4	115 ± 3	161 ± 9	67 ± 3	51 ± 2	124 ± 4	27 ± 2	45 ± 2	170 ± 8	
6,0	57 ± 2	30 ± 2	49 ± 2	64 ± 2	33 ± 2	65 ± 2	15 ± 1	67 ± 2	11 ± 1	40 ± 2	190 ± 11	
7,0	39 ± 1	26 ± 1	12 ± 1	36 ± 2	24 ± 1	52 ± 2	18 ± 1	39 ± 2	12 ± 1	30 ± 1	230 ± 14	

* зерна пшеницы замачивались при 5 °С.

** пероксидаза хрена — препарат фирмы «Reanal».

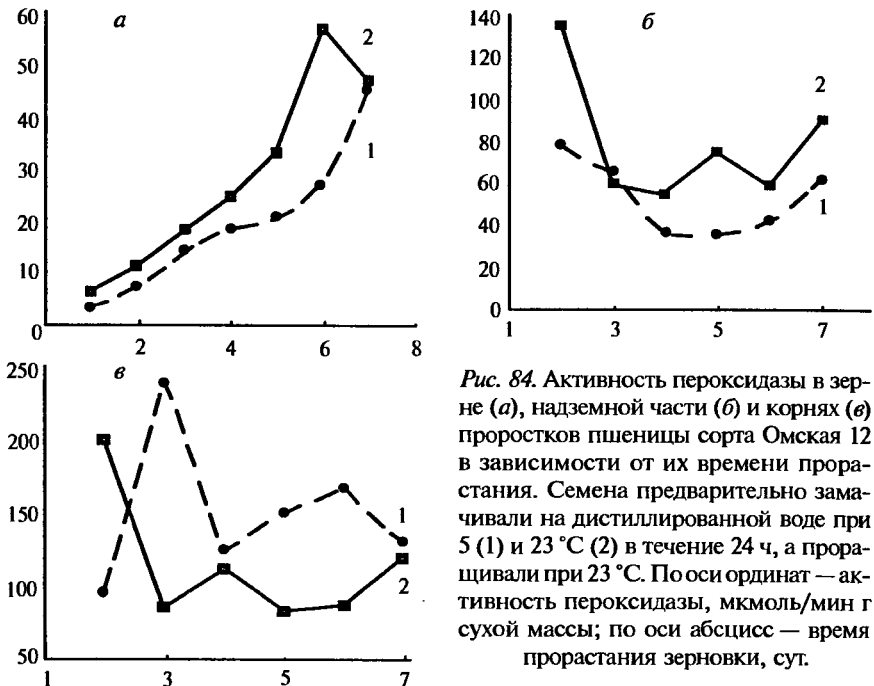


Рис. 84. Активность пероксидазы в зерне (а), надземной части (б) и корнях (в) проростков пшеницы сорта Омская 12 в зависимости от их времени прорастания. Семена предварительно замачивали на дистиллированной воде при 5 (1) и 23 °С (2) в течение 24 ч, а проращивали при 23 °С. По оси ординат — активность пероксидазы, мкмоль/мин г сухой массы; по оси абсцисс — время прорастания зерновки, сут.

является, по-видимому, проявление компенсаторных антиоксидантных механизмов, направленных на предотвращение развития окислительного повреждения тканей [Бурлакова и др., 1975], вызванных воздействием низких температур, поскольку ключевую роль в развитии окислительного повреждения играют активные формы кислорода, органические радикалы [Владимиров, Арчаков, 1972], образование которых наиболее интенсивно протекает в корнях растений [Минибаева и др., 1997].

Важную роль в повышении активности пероксидазы могут выполнять конформационные перестройки глобулы вновь синтезированных форм пероксидазы при низкой температуре, затрагивающие активный центр фермента. Причиной этих изменений могут служить SH-группы, которые каждый изофермент пероксидазы содержит по 6–8 и в нативном ферменте синтезированном при 20–22 °С они образуют 3–4 дисульфидные связи [Shin et al., 1971]. Причиной изменения структуры пероксидазы может быть нарушения фолдинга при низких положительных температурах [Упоров, Егоров, 1997], в результате этого на поверхности глобулы фермента появляются свободные SH-группы. Приобре-

тенная таким образом лабильность структуры проявляется в повышении активности фермента. Аналогичные изменения наблюдали у рибулозодифосфаткарбоксилазы холодостойкой линии томата, у которой сохранение SH-групп сопровождалось проявлением более высокой устойчивостью к низким температурам [Graham, Patterson, 1982].

Увеличение активности пероксидазы может быть вызвано синтезом на холоде в семенах пшеницы новых изоферментов пероксидазы или накоплением соединений, являющихся субстратами фермента, индуцирующих его синтез, что будет проявляться в возрастании активности пероксидазы. Однако высокие концентрации субстратов пероксидазы могут ингибировать фермент, способствуя таким образом увеличению концентрации перекиси водорода в клетках.

Подтверждением высказанных предположений являются результаты по динамике содержания МДА и АО в корнях и надземной части проростков пшеницы зерновок I и II групп (рис. 85). Видно, что показатели уровня ПОЛ и содержания АО находятся в прямой зависимости ($r = 0,5$). Повышение содержания АО преимущественно сопровождается повышением ПОЛ, тогда как активность пероксидазы возрастает с уменьшением содержания антиоксидантов ($r = -0,65$). В случае увеличения содержания АО отмечается понижение активности пероксидазы, а увеличение активности пероксидазы сопровождается понижением уровня ПОЛ ($r = -0,65$). Величины показателей корреляции, возможно, были выше, если бы при проведении анализа учитывалось влияние всех компонентов антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза и т.д.).

Наблюдаемые изменения возможно объяснить в рамках единого представления о роли пероксидазы и АО, являющихся компонентами антиоксидантной системы в регулировании процессов перекисного окисления в живых организмах. Пероксидаза способна использовать в качестве субстратов антиоксиданты и перекись водорода. Фермент катализирует реакцию, в которой АО окисляются, а перекись водорода восстанавливается до воды. Однако в высоких концентрациях антиоксиданты способны ингибировать фермент и таким образом способствуют увеличению уровня ПОЛ в клетках. Взаимная регулируемость системы позволяет контролировать ПОЛ в живых организмах и поддерживать его на определенном, постоянном уровне.

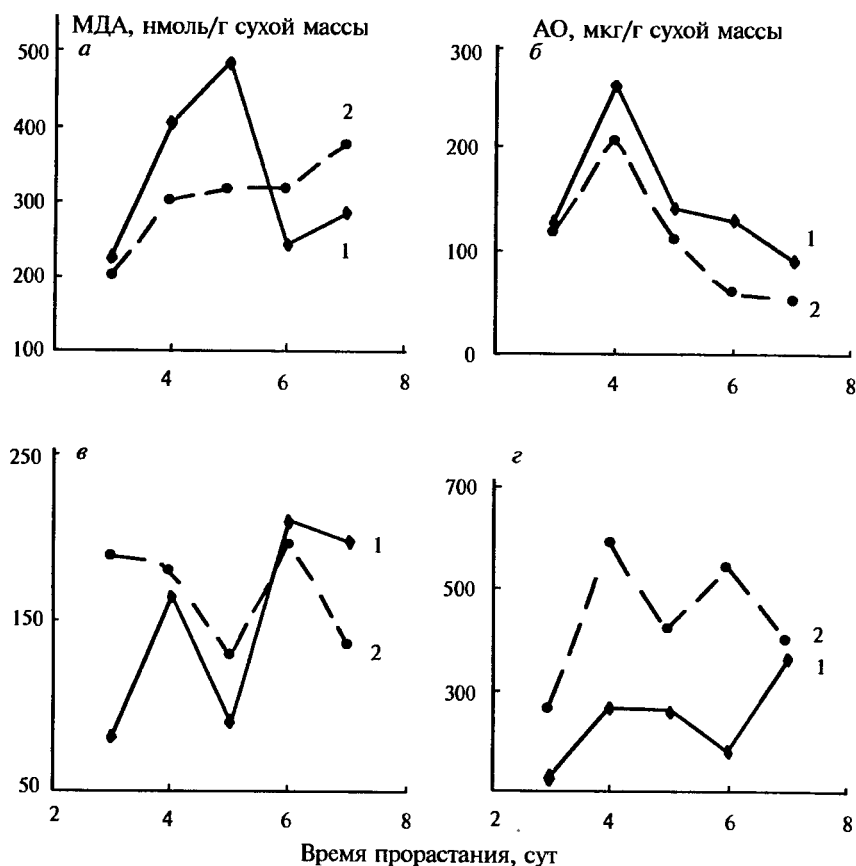


Рис. 85. Влияние температуры замачивания семян пшеницы сорта Омская 12 на содержание малонового диальдегида и антиоксидантов в их надземной части (а, б) и корнях (в, г) этилированных проростков. Условия те же, что на рис. 84.

Нами изучены каталитические параметры пероксидазы 7-ми суточных проростков и корней пшеницы. Показано, что различия в величинах K_m по ОДН пероксидазы проростков и корней (табл. 25), а также V_m проростков пшеницы зерновок I и II групп незначительны (табл. 26). Основные изменения наблюдаются у K_m по АК пероксидазы корней пшеницы зерновок I и II групп. Величины K_m зерновок I группы выше в 1,5–2 раза, по сравнению с зерновками II группы. Значения V_m по ОДН и по АК пероксидазы корней пшеницы зерновок I группы в 1,5–2 раза выше, чем корней пшеницы зерновок II группы. Тогда как K_m по АК пероксидазы корней пше-

ницы зерновок II группы в 2–7 раз ниже, у пероксидазы надземной части проростков этой же группы. Следует отметить различия в показателях K_m по ОДН корней пшеницы, которые были в 1,5–3 раза выше, чем у пероксидазы хрена. Так же можно отметить сильные различия в K_m по АК для пероксидазы хрена, от пероксидазы из надземной части и корней проростков пшеницы. K_m по АК в 3–13 и 6–19 раз ниже у корней пшеницы зерновок I и II групп соответственно, чем у пероксидазы хрена. Такую высокую разницу в значениях K_m можно объяснить, во-первых, за счет того, что в исследованиях были использованы гомогенаты корней пшеницы, содержащие весь спектр изоферментов пероксидазы. Тогда как пероксидаза хрена являлась очищенным препаратом, в составе которого преимущественно изоферменты С и В [Андреева, 1988]. Во-вторых, наличием в гомогенате тканей большого количества антиоксидантов, являющихся субстратами пероксидазы, в присутствии которых окисление ОДН и АК может возрастать [Рогожин, Верхотуров, 1998а].

Поскольку пероксидаза и антиоксиданты входят в единую систему защиты растений от окислительного стресс-

Таблица 26
Величины V_m (мкмоль/мин г сухой массы) и K_{cat} (сек⁻¹) реакций пероксидазного окисления о-диангидрина (ОДН) и аскорбиновой кислоты (АК), катализируемых пероксидазой зерен и 7-ми суточных проростков (надземная часть и корни) пшеницы сорта Омская 12

рН	Сухое зерно		Проростки пшеницы								Корни хрена***	
			надземная часть				корни					
	ОДН	АК	ОДН*	ОДН	АК	ОДН*	АК*	ОДН	АК	ОДН**	АК**	
5,0	28 ± 2,2	2,9 ± 0,11	43 ± 2,2	40 ± 1,8	55 ± 3,4	129 ± 5,9	50 ± 2,3	87 ± 4,2	25 ± 2,2	2500 ± 200	18 ± 1,2	
5,5	21 ± 2,1	2,0 ± 0,09	57 ± 2,6	47 ± 2,2	28 ± 2,3	154 ± 6,7	36 ± 1,6	103 ± 9,6	21 ± 1,7	3000 ± 250	7 ± 0,3	
6,0	14 ± 1,2	1,7 ± 0,35	25 ± 1,8	28 ± 1,3	8 ± 0,4	117 ± 5,7	22 ± 1,0	62 ± 2,8	16 ± 1,2	2200 ± 200	9 ± 0,4	
7,0	4 ± 0,2	1,3 ± 0,04	8 ± 0,5	9 ± 0,4	9 ± 0,3	50 ± 2,5	21 ± 1,1	20 ± 0,8	15 ± 1,0	600 ± 50	4 ± 0,2	

* зерна пшеницы замачивались при 5 °С;

** значения K_{cat} ;

*** пероксидаза хрена — препарат фирмы «Reanal».

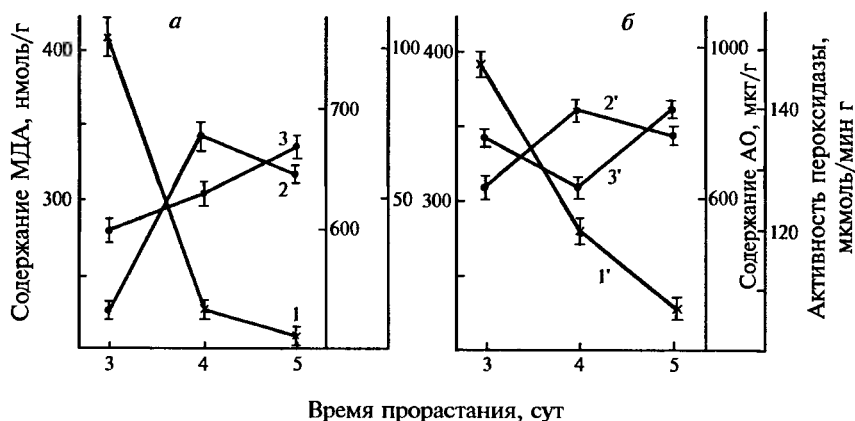


Рис. 86. Динамика содержания антиоксидантов (1, 1'), малонового диальдегида (2, 2') и активность пероксидазы (3, 3') в надземной части (а) и корнях (б) проростков пшеницы сорта Омская 12. Предварительно зерна пшеницы замачивали при 5 °С в течение 24 ч, проращивание проводили при 28 °С.

са, нами изучено их участие в регулировании уровня ПОЛ на 3–5 день прорастания проростков пшеницы, проращивание которых проводили при 28 °С (рис. 86). Видно, что в надземной части проростков пшеницы уровень АО понижается на 4–5 сутки в 1,4–1,5 раз, при повышении активности пероксидазы в 1,8 раза. По-видимому, в этот период контроль за уровнем ПОЛ в побегах резко снижается, что проявляется в возрастании содержания МДА в 1,5 раза. В корнях проростков пшеницы на 4-й день прорастания уровень ПОЛ возрастает в 1,5 раза, при этом содержание АО и активность пероксидазы понижается в 2,4 и 1,2 раза соответственно.

Таким образом, контроль за уровнем ПОЛ в проростках пшеницы осуществляют как низкомолекулярные антиоксиданты, так и пероксидаза. При этом известно, что в надземной части проростков больше содержится АО и меньше пероксидазы, чем в корнях проростков пшеницы. Поэтому ведущая роль в регулировании ПОЛ в надземной части преимущественно выполняют низкомолекулярные антиоксиданты, где за счет активного фотосинтеза идет их накопление. Тогда как в корнях эта функция возложена на пероксидазу, высокая активность которой обеспечивает поддержание определенного уровня ПОЛ. Поскольку высокие концентрации АО могут ингибировать пероксидазу, то

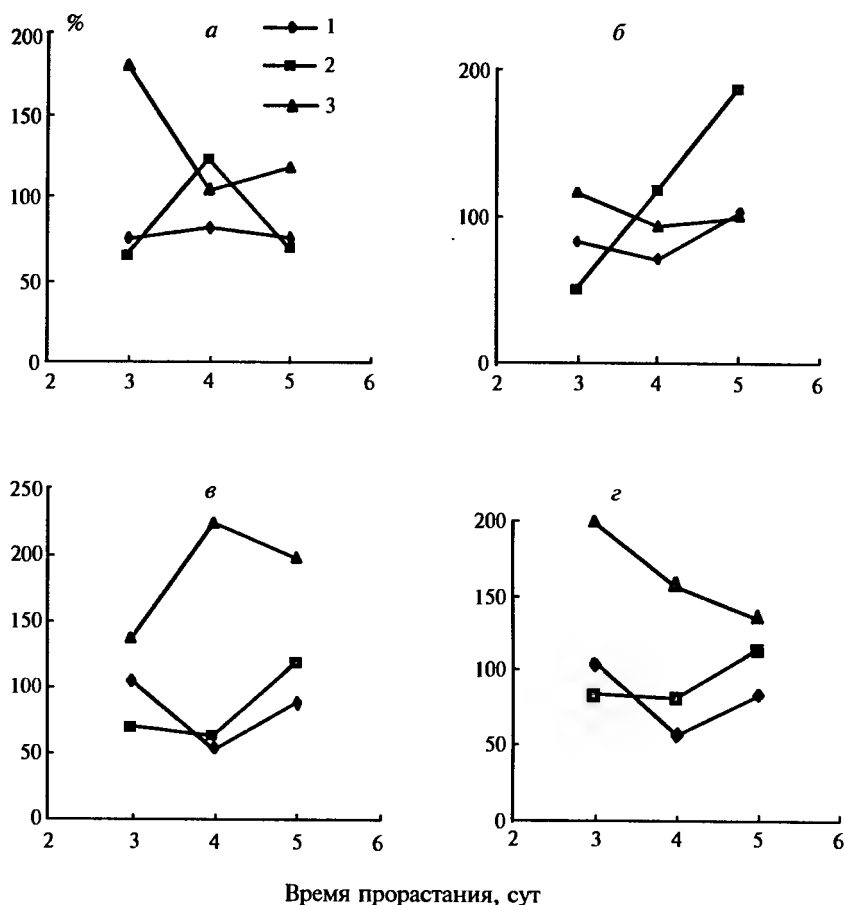


Рис. 87. Динамика содержания антиоксидантов, малонового диальдегида и активность пероксидазы в надземной части проростков пшеницы сорта Омская 12 от времени проращивания. Семена замачивали при 5 °С, время, ч: а — 6, б — 12, в — 18, г — 24. Проращивание семян проводили при 28 °С. По оси абсцисс — время проращивания зерновки, сут; по оси ординат — активность пероксидазы, количество малонового диальдегида и антиоксидантов, % к контролю. 1 — МДА; 2 — АО; 3 — ПО.

по-видимому, накопление или понижение содержания АО в проростках может регулировать активность фермента.

Для подтверждения этого предположения мы изучили влияние низкой температуры (+5 °С) во время 24 ч набухания зерновок на динамику уровня ПОЛ, АО и активность пероксидазы проростков пшеницы в течение 3–5 суток проращивания. Как видно

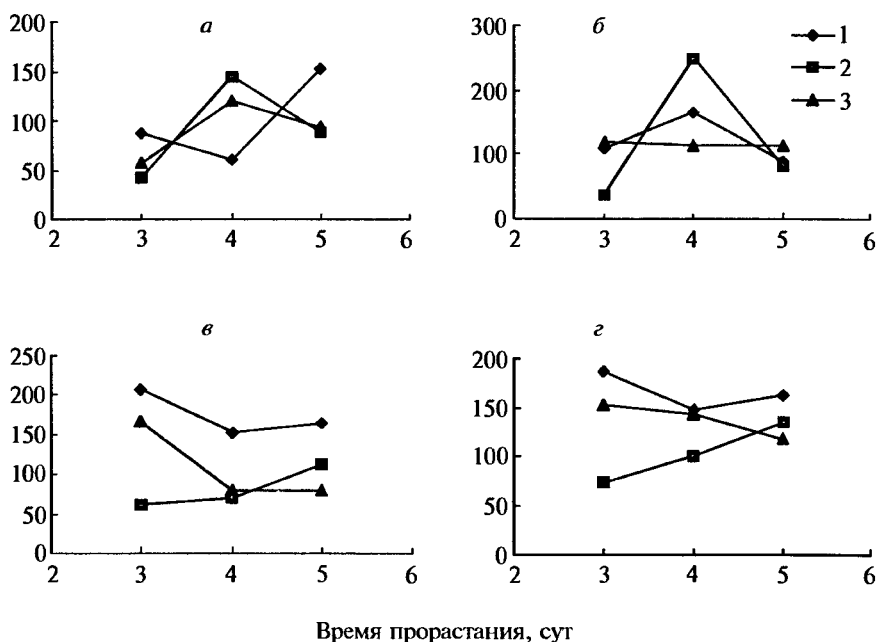


Рис. 88. Динамика содержания малонового диальдегида, антиоксидантов и активности пероксидазы в надземной части проростков пшеницы сорта Омская 12 от времени проращивания. Условия те же, что на рис. 87. По оси абсцисс — время прорастания зерновки, сут; по оси ординат — активность пероксидазы, количество малонового диальдегида и антиоксидантов, % к контролю. 1 — МДА; 2 — АО; 3 — ПО.

из рисунков 87 и 88, в основном, наблюдаются взаимозависимые колебания исследуемых параметров. При этом понижение активности пероксидазы сопровождается возрастанием уровня ПОЛ, а повышение содержания АО приводит к понижению активности пероксидазы. Понижение активности пероксидазы чаще всего наблюдается при повышении уровня АО, что, по-видимому, обусловлено ингибированием фермента высокими концентрациями антиоксидантов.

Таким образом, установлено взаимное влияние пероксидазы и низкомолекулярных антиоксидантов при прорастании зерновок пшеницы. Показано, что пероксидаза активно участвует в формировании пусковых механизмов прорастания зерновок пшеницы. Поскольку в реакциях пероксидазного окисления различных субстратов, в том числе и антиоксидантов, могут образовываться

свободные радикалы, способные ускорять процессы свободно-радикального окисления, инициирующие ПОЛ на начальных этапах прорастания зерновок пшеницы. Таким способом пероксидаза, являясь окислительно-восстановительным ферментом, по-видимому, осуществляет контроль за уровнем перекиси водорода и содержанием антиоксидантов в семенах и проростках пшеницы, а АО, накапливаясь в тканях, участвуют в реакциях подавления образования свободных радикалов, при этом их избыток может ингибировать фермент. Тогда как в процессе метаболизации антиоксидантов изменяется их концентрация, что может проявляться в регулировании активности пероксидазы и осуществлении общего контроля над деятельностью системы антиоксидантной защиты. Поэтому действие низких положительных температур на семена во время их замачивания, характеризующееся изменением активности пероксидазы и содержанием АО в прорастающих семенах и проростках пшеницы, может свидетельствовать о проявлении реактивности проростков на действующий фактор. Поэтому в совокупности эти показатели могут служить критериями адаптированности проростков к стрессирующим факторам.

5.6. РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ИНИЦИИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ПРОРАСТАНИЯ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Биологически активные вещества очень часто используются для повышения всхожести семян [Михно и др., 1997]. В зависимости от природы они могут регулировать протекание метаболических процессов, активировать или ингибировать различные ферменты, влиять на проницаемость мембран клеток. Среди этой группы следует выделить соединения обладающие антиоксидантной активностью, к которым относятся строфантин, дигоксин, хлорпромазин, викасол, аскорбиновая кислота, гидрохинон и др. Эти соединения в высоких концентрациях, как было показано выше, ингибировали пероксидазу *in vitro* [Рогожин, Верхотуров, 1997; 1998а; 1998б]. Обладая разным механизмом действия, они в малых концентрация активировали прорастание зерновок, а в больших — понижали их всхожесть (табл. 27). При этом проявляется индивидуальная чувствительность зерновок пшеницы к используемым соединениям. Низкие концентрации строфантина, аскорбиновой кислоты, норадреналина, салицилата натрия,

Таблица 27

**Влияние различных концентраций функционально активных веществ
на всхожесть семян пшеницы сорта Омская 12**

Реагент	Концентрация, мМ	Всхожесть, %	Реагент	Концентрация, мМ	Всхожесть, %
Контроль	—	76±6	Норадреналин	0,001	84±6
Этанол	0,100	80±8		0,006	83±7
	0,500	87±9		0,060	81±6
	1,000	79±7		0,600	78±5
	10,000	76±6		6,000	50±3
	100,000	67±6	Аскорбиновая кислота	0,002	85±6
	500,000	48±3		0,020	82±5
	1000,000	24±2		0,200	84±6
	1200,000	12±1		2,000	90±8
	1400,000	3±1		10,000	69±4
	1600,000	0		50,000	64±3
	1800,000	0		100,000	43±2
Строфантин	0,028	90±7		500,000	25±2
	0,280	66±5		1000,000	11±1
	2,800	68±5	2,4-Динитро-фенол	0,001	79±7
	28,000	64±4		0,010	78±6
	280,000	67±6		0,100	72±5
Дигоксин	0,014	63±4		1,000	5±1
	0,140	72±7		5,000	0
	1,400	75±8		10,000	0
	14,000	65±6	Салицилат натрия	0,010	89±7
	28,000	50±4		0,100	84±6
	55,000	36±3		1,000	83±6
	83,000	8±1		10,000	72±5
	110,000	0		100,000	8±1
	138,000	0		1000,000	0
Гидрохинон	0,050	76±7	Аминазин	0,007	86±4
	0,500	74±6		0,070	82±3
	5,000	74±6		0,700	80±3
	7,500	66±5		7,000	35±2
	10,000	54±4		70,000	0
	25,000	29±2	Викасол	0,300	74±7
	50,000	9±1		30,000	79±8

Примечание. Замачивание и проращивание семян проводили в растворах БАВ при 23 °С. После 24 часов замачивания семена проращивали при естественном освещении в течение 7 дней. Реагенты растворяли в дистиллированной воде. Представлены средние данные и их стандартные ошибки для трех независимых опытов по 100 семян в каждом.

хлорпромазина и этанола повышали всхожесть зерновок пшеницы на 15–20%, что, возможно, обусловлено связыванием АО с поверхностными рецепторами клеток, проявляя рецепторный путь активирования. Кроме этого антиоксиданты могут окисляться ферментами, расположенными на наружной поверхности мембран, превращаясь в свободные радикалы, которые в свою очередь и проявляют стимулирующий эффект. Действие свободных радикалов в первую очередь стимулирует дыхательную активность митохондрий, что способствует активации метаболических процессов в клетке. Аналогичные эффекты проявляются при использовании веществ в низких или в супернизких концентрациях. Поэтому в покоящихся семенах малые концентрации антиоксидантов способны проявлять стимулирующий эффект через избирательное влияние на рецепторные системы клеток или используя активирующую способность свободных радикалов, при этом может реализоваться один из этих путей или оба способа сразу. Тогда как высокие концентрации исследуемых соединений понижали всхожесть зерновок пшеницы, что обусловлено блокированием избытка антиоксидантов дыхательной активности митохондрий. По величине ингибирующего эффекта исследованные соединения можно расположить в следующем порядке: 2,4-динитрофенол > гидрохинон > хлорпромазин > дигоксин > салицилат натрия > этанол > норадреналин > строфантин > викасол. Выраженный ингибирующий эффект 2,4-динитрофенола, по-видимому, можно объяснить за счет того, что он способен разобщать окислительное фосфорилирование, перенаправляя поток протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, стимулируя митохондриальную АТФазу [Досон и др., 1991].

На основании полученных результатов можно предложить использовать семена пшеницы при проведении исследований по изучению токсичности различных соединений, используемых в сельском хозяйстве и медицине.

Известно, что к факторам повышающим всхожесть семян относятся УФ-излучение, низкие и высокие температуры. Эффект малых доз УФ-облучения проявляется в иницировании образования свободных радикалов, стимулирующих процессы прорастания зерновок пшеницы. Тогда как совместное действие низких температур и УФ-облучения на семена недостаточно изучены. При этом известно, что использование сочетанного действия низких температур и этанола может повышать всхожесть зерно-

вок пшеницы. Так, например, после сеникации пшеницы аммиачной селитрой в фазе молочно-восковой спелости всхожесть зерновок понижалась до 56% с сохранением 100% жизнеспособности. Обработка таких зерновок 10 мМ раствором этанола при 4 °С в течение 1,5–4,5 часов снимала гипобиотический эффект селитры, повышала всхожесть зерновок до 96–100% [Рогожин, Егорова, 1990].

Установлено, что высокие концентрации этанола понижают всхожесть зерновок пшеницы [Рогожин, Егорова, 1990; Андрианова, Бакуридзе, 1996], тогда как малые дозы УФ-облучения могут повышать их всхожесть [Рогожин, Курилюк, 1996]. Известно, что свет может усиливать чувствительность растений к низким температурам. Так, например, выращивание растений при 10–13 °С и высокой радиации способствует появлению некротических пятен на листьях и способствует снижению интенсивности фотосинтеза при стабильном содержании хлорофилла [Scott, 1970; Taylor, Rowley, 1971]. Нами изучено влияние 5 и 60 мин УФ-излучения на всхожесть зерновок пшеницы сорта Омская 12 (табл. 28). Видно, что у зерновок, предварительно подвергнутых УФ-облучению всхожесть несколько понижается, тогда как УФ-облучение зерновок после замачивания в различных растворах этанола повышает их всхожесть на 12–15%. Причем это особенно проявляется при длительном, в течение 60 мин УФ-облучении.

Таблица 28

Всхожесть семян пшеницы сорта Омская 12 при совместном действии этанола и УФ-облучения (%)

Концентрация этанолa, М	Без УФ-облучения		УФ-облучение до замачивания семян				УФ-облучение после замачивания семян			
			5 мин		60 мин		5 мин		60 мин	
Контроль	59±3	70±5*	59±3	61±3*	59±3	65±3*	53±3	73±4*	70±5	72±5*
0,2	44±2	58±4	50±3	63±3	53±3	73±3	59±3	68±4	66±4	68±4
0,5	38±2	54±3	45±2	47±2	44±3	58±2	52±3	53±3	48±3	58±3
1,0	24±2	34±2	25±2	32±2	10±2	12±1	22±2	40±3	28±2	33±2
1,2	14±1	22±1	8±1	10±1	4±1	8±1	11±1	20±2	21±2	25±2
1,4	3±1	8±1	2±1	5±1	2±1	2±1	7±1	2±1	13±1	10±1
1,6	0	0	0	0	0	2±1	2±1	3±1	5±1	6±1

* Замачивание и проращивание семян проводили при 14 °С

Проращивание зерновок при низкой температуре (14 °С) стимулирует прорастание зерновок, понижая ингибирующий эффект этанола. УФ-облучение таких зерновок дополнительно может стимулировать прорастание зерновок (табл. 28).

Исходная влажность зерновок обычно составляет 5–6%. При погружении в воду в течение 16–24 часов идет активное поглощение воды семенами. В этот период запускаются основные биохимические процессы, обеспечивающие последующее прорастание зерновок. Биологически активные соединения по разному могут проявлять свое влияние в этот период. Это время является наиболее важным в проявлении специфичности действия функциональных веществ. Показано, что всхожесть зерновок пшеницы имеет выраженный колебательный характер в зависимости от используемой концентрации вещества. Так, замачивание зерновок в течение 24 часов в малых концентрациях этанола может повышать их всхожесть. Особенно это заметно в течение первых 4–8 часов (рис. 89). Аналогичный эффект отмечен и в работе [Зауралов и др., 1997]. Высокие концентрации этанола понижали всхожесть зерновок пшеницы, однако влияние этанола зависело от времени замачивания. Условно на кривой всхожести зерновок от времени замачивания в растворе 1 М этанола можно выделить три периода. Первый период — активационный, наблюдающийся при выдерживании зерновок в этаноле в течение первых 2-х часов, при этом всхожесть зерновок повышается на 10–15%. Второй период — повышенной сопротивляемости к действующему фактору, который выявляется в течение 2–12 часов. В этот период можно наблюдать резкие эпизодические всплески повышения всхожести зерновок при общей тенденции к ее понижению. Третий период — устойчивого понижения всхожести, когда продолжительное действие используемого вещества последовательно уменьшает всхожесть зерновок. Естественно, что выделение этих периодов в действии функционально активных веществ условно и зависит от при-

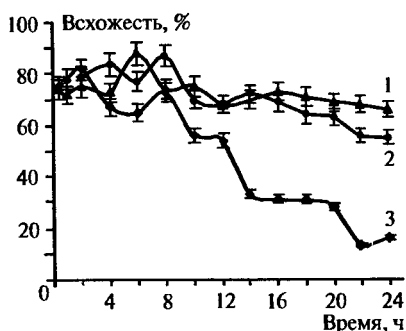


Рис. 89. Динамика всхожести зерновок пшеницы сорта Омская 12 от времени замачивания семян в водных растворах этанола, М: 1 — 0,0005, 2 — 0,5, 3 — 1,0.

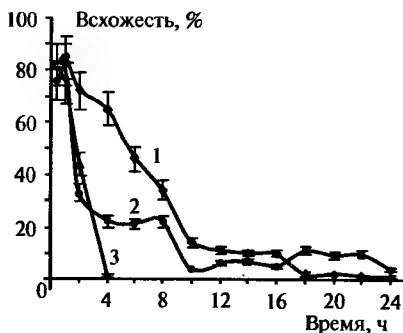


Рис. 90. Динамика всхожести зерновок пшеницы сорта Омская 12 от времени замачивания семян в водных растворах: 1 — 1 мМ 2,4-динитрофенола, 2 — 7 мМ хлорпромазина, 3 — 138 мМ дигоксина.

роды соединений и их концентрации. Большие концентрации высокотоксичных соединений могут сглаживать динамику проявления реактивности зерновок на действующий фактор. Так, замачивание зерновок пшеницы в растворах 2,4-динитрофенола, хлорпромазина и дигоксина может проявляться в своеобразной динамике понижения всхожести зерновок. Из рисунка 90 видно, что высокие концентрации этих реагентов могут обвальное понижать всхожесть зерновок пшеницы. Однако несмотря на то, что

использовались высокие концентрации реагентов отмечается в первые 60 мин замачивания повышение всхожести зерновок, а в дальнейшем идет линейное ее снижение в течение 4–8 часов и последующее угнетение до минимального уровня всхожести зерновок. Однако замачивание зерновок при низкой температуре может понижать ингибирующий эффект используемых реагентов, возможно, за счет снижения проницаемости мембран для раство-

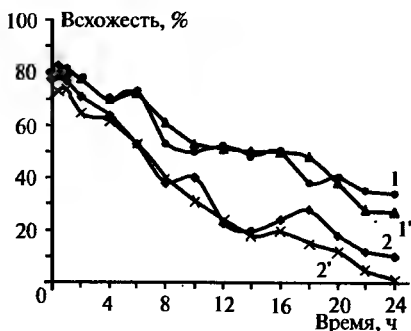


Рис. 91. Динамика всхожести зерновок пшеницы сорта Омская 12 от времени замачивания семян в водных растворах 0,1М салицилата натрия (1, 2) и 2 М этанола (1', 2') при температуре замачивания 5° (1, 1') и 23°С (2, 2').

ра с БАВ [Levitt, 1980]. На рис. 91 представлены кривые всхожести зерновок пшеницы предварительно замоченных в 0,1 М растворе салицилата натрия и 2 М растворе этанола при температуре 5° и 23 °С. Видно, что замачивание зерновок при низкой температуре может снимать ингибирующий эффект высоких концентраций реагентов, сглаживая при этом динамику понижения всхожести зерновок с проявлением повышенной их устойчивости к воздействию фактору. На кривых понижения всхожести зерновок пшени-

цы можно выделить период повышенной устойчивости зерновок к биологически активным соединениям, который проявляется в основном между 8 и 16 часами замачивания. Неоднородность кривых всхожести зерновок позволяет предположить проявления у них компенсаторных механизмов, противодействующих проникновению с водой функционально активных веществ.

Аналогичные зависимости многократно наблюдали при изучении ускоренного старения семян, отмечая увеличение всхожести семян после ее начального снижения [Ellis et al., 1982; Likhatchev et al., 1984; Priestley, 1986; Реймерс, 1987; Зелинский, 1989; San, Leopold, 1993; Веселова и др., 1999]. Так, например, при проведении ускоренного старения семян гороха при 40 °C и 80%-ной относительной влажности воздуха показано, что сила индивидуального семени, его способность произвести нормальный проросток падает скачкообразно. Постепенное уменьшение силы всей популяции семян при старении происходит не вследствие одновременного постепенного снижения силы у всех семян, а в результате скачкообразного перехода отдельных семян в субпопуляцию с низкой силой. Поэтому временное улучшение состояния семян происходят не из-за активации клеточных репарационных систем, а скорее всего увеличение всхожести обусловлено физико-химическими изменениями структур семян при старении [Веселова и др., 1999].

Известно, что пероксидаза, алкогольдегидрогеназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа играют важную роль в покое и прорастании семян пшеницы. В прорастающих семенах активность пероксидазы возрастает, а активность АДГ понижается. У непроросших семян активность АДГ повышается в 2,5–5,5 раза, при понижении активности пероксидазы в 2,8–3,5 раза по сравнению с прорастающими семенами. Высокая разница в величинах активности ферментов, по-видимому, может указывать на разное их участие в механизмах прорастания семян пшеницы [Рогожин, Верхотуров, 1998a].

Действие БАВ может проявляться в понижении скорости протекания биосинтетических процессов или ингибировании активности ферментов семян пшеницы. Причем высокие концентрации антиоксидантов могут понижать активность пероксидазы и за счет этого регулировать продолжительность гипобиотического состояния семян. Возможно, что ведущую роль в поддержании гипобиоза семян пшеницы выполняет пероксидаза, умень-

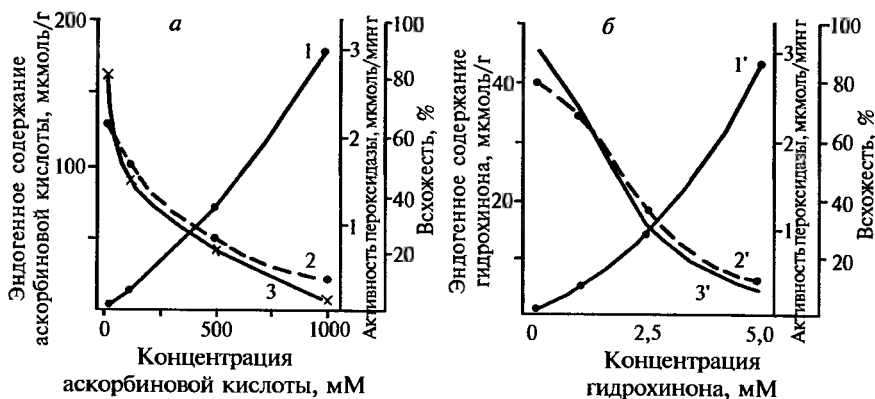


Рис. 92. Динамика всхожести семян и эндогенное содержание аскорбиновой кислоты и гидрохинона в зерновках пшеницы сорта Омская 12 после их замачивания в водных растворах аскорбиновой кислоты (а) и гидрохинона (б) различных концентраций: 1, 1' — содержание аскорбиновой кислоты и гидрохинона соответственно; 2, 2' — всхожесть семян; 3, 3' — активность пероксидазы.

шение активности которой углубляет покой семян, что проявляется в задержке их прорастания и понижении всхожести. Для подтверждения этого предположения мы изучили влияние различных концентраций АК и гидрохинона на всхожесть семян пшеницы, определяя в них содержание этих антиоксидантов и активность пероксидазы (рис. 92). Замачивание семян проводили при 23 °С в течение 24 ч. Как видно из рис. 92 набухание семян в различных растворах АК и гидрохинона приводит к понижению их всхожести при одновременном понижении активности пероксидазы, которая коррелирует с возрастанием содержания в семенах пшеницы АК и гидрохинона. Установлена положительная корреляция между всхожестью семян и активностью пероксидазы, которые находятся в обратной зависимости с показателями содержания антиоксидантов в семенах пшеницы. Поскольку пероксидаза входит в систему антиоксидантной защиты живых организмов и поэтому совместно с каталазой, супероксиддисмутазой и другими ферментами пероксидаза может предохранять организмы от действия активных форм кислорода, защищая ткани от окислительного шока. Возможно поэтому в семенах пшеницы, а затем и в проростках отмечается высокая активность пероксидазы. При набухании семян в воде в них возрастает дыхание, что сопровождается увеличением активности пероксидазы, особенно проявляющееся при прорастании семян. Фермент окис-

ляет широкий спектр органических соединений, среди которых имеются и вещества обладающие антиокислительной активностью, в высоких концентрациях ингибирующих пероксидазу. Вероятно поэтому высокие экзогенные концентрации АК и гидрохинона могут ингибировать пероксидазу семян пшеницы, при этом понижая их всхожесть.

После действия высоких концентраций АК и гидрохинона всхожесть семян пшеницы составляла 8–15%. Замачивание семян в 1 М растворе АК приводило к понижению активности пероксидазы в корнях и надземной части на 2-ые сутки прорастания до 30 и 23, на 3-ьи — 55 и 45, на 4-тые — 55 и 70, а на 6-тые — 62 и 87% соответственно (рис. 93, а). Набухание семян пшеницы в растворах 50 мМ гидрохинона понижало активность пероксидазы в корнях и надземной части проростков на 2-ые сутки прорастания до 15 и 10, на 3-ьи — 20 и 17, на 4-тые — 27 и 19, на 6-тые — 45 и 42% соответственно (рис. 93, б). Тогда как, набухание семян пшеницы в растворах низких концентраций АК и гидрохинона практически не влияло на активность пероксидазы в семенах (рис. 93, а, б). Для подтверждения избирательности действия антиоксидантов по отношению пероксидазы зерновок пше-

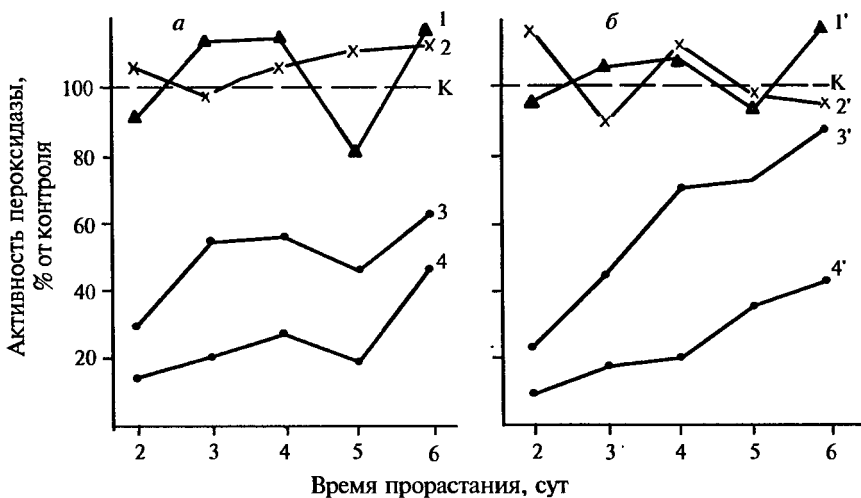


Рис. 93. Динамика активности пероксидазы в корнях (а) и надземной части (б) проростков пшеницы сорта Омская 12 в зависимости от времени прорастания после их замачивания в водных растворах аскорбиновой кислоты и гидрохинона: 1, 1' и 4, 4' — 0,5 и 50 мМ растворы гидрохинона соответственно; 2, 2' и 3, 3' — 2 и 1000 мМ растворы аскорбиновой кислоты соответственно; К — контроль.

Таблица 29

Содержание аскорбиновой кислоты (мг/100 г сухой массы) в семенах и проростках пшеницы сорта Омская 12 во время прорастания

Время прорастания, сут	Семена		Проростки	
	непроросшие	проклюнувшиеся	корни	надземная часть
Контроль(сухие)	15,2±0,5 (100)	—	—	—
1	24,8±0,8 (163)	—	—	—
2	26,4±0,9 (174)	22,4±0,8 (147)	—	—
3	26,8±0,9 (176)	19,2±0,6 (126)	3,8±0,2 (25)	7,2±0,3 (47)
4	23,6±0,6 (155)	8,0±0,3 (53)	3,6±0,2 (24)	4,0±0,2 (26)

ницы нами было изучено их влияние на активность других ферментов зерновок, в частности, алкогольдегидрогеназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Показано, что независимо от концентрации используемых антиоксидантов активности АДГ и Г6ФДГ практически не изменялись в семенах после 24 ч замачивания их в аналогичных растворах аскорбиновой кислоты и гидрохинона.

Подтверждением участия АК в регулировании покоя семян являются выполненные нами исследования эндогенного содержания АК в семенах пшеницы до и после замачивания их в воде (табл. 29). Показано, что уровень АК в непроросших семенах пшеницы на протяжении всего срока прорастания сохраняется на достаточно высоком уровне и в 1,5–1,8 раз выше, чем в сухих семенах. Отмечается явная тенденция к понижению содержания АК в проклюнувшихся семенах и в проростках пшеницы по сравнению с уровнем этих антиоксидантов в непроросших семенах. На четвертые сутки прорастания в надземной части и корнях проростков пшеницы уровень АК понижается в 4 раза (табл. 29). Эти изменения в содержании АК могут служить подтверждением участия эндогенных антиоксидантов в формировании механизмов покоя семян пшеницы.

Глубокий органический покой отмечается у семян дикорастущих растений [Николаева, 1985]. Поэтому мы извлекли из семян

касатика щетинистого, красоднева желтого, ландыша майского, вишни песчаной, кизильника блестящего путем экстракции биологически активные вещества и изучили их влияние на покой семян пшеницы. Замачивание в экстрактах дикорастущих растений семян пшеницы, ячменя, овса не приводило к изменению их всхожести. По-видимому, покой дикорастущих растений регулируется не одним, а несколькими функционально активными веществами, экстракция которых приводит к понижению их концентрации в среде и вследствие этого нивелированию их гипобиотического эффекта.

Еще одним доказательством участия АО в формировании механизмов покоя у семян пшеницы могут служить данные о пребывании семян в условиях повышенной влажности. Из таблицы 30 видно, что пребывание семян пшеницы в течение 1–4-х суток в воде или растворах этанола и строфантина приводит к резкому понижению их всхожести до 9–22%. При этом в зерновках отмечается повышение содержания АО в 1,7–2,2 раза, с одновременным понижением пероксидазной активности на 28–36%. Предварительное УФ-облучение семян пшеницы провоцирует в них протекание свободнорадикальных процессов, поэтому в ответ на действующий фактор в зерновках содержание АО может возрастать в 2–3 раза, особенно это проявляется в первые 15 мин УФ-облучения. Полученные данные свидетельствуют о том, что пероксидаза способна выполнять роль инициатора процессов прорастания семян, поскольку для углубления покоя семян требуется понижение пероксидазной активности, что, по-видимому, достигается за счет увеличения содержания АО. Эти данные наглядно показывают взаимосвязь между пероксидазной активностью и содержанием АО при реализации механизмов формирования покоя семян.

Таким образом, участие антиоксидантов в механизме покоя семян, по-видимому, обусловлено ингибированием ферментов антиоксидантной системы защиты растений, в особенности, пероксидазы, что проявляется в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. Понижение активности фермента высокими концентрациями антиоксидантов способствует углублению покоя семян пшеницы, а активирование пероксидазы — ускоренному их выходу из состояния гипобиоза и быстрому прорастанию.

Кроме этого, насыщая зерновки ксенобиотиками можно добиваться повышения их посевных качеств, а также сопротивляемости зерновок и растений к экзогенным патогенным факторам

Таблица 30
 Содержание АО, активность пероксидазы и всхожесть зерен пшеницы сорта Омская 12 в зависимости от времени их замачивания в воде, а также в растворах этанола и строфантина. (УФ-облучению подвергали семена с влажностью 5–8% перед их замачиванием в воде)

Фактор воздействия	АО, мкг/г влажной массы (%)				ПО, мкмоль/мин г влажной массы (%)				Всхожесть, %			
	Время замачивания семян, сут				Время замачивания семян, сут				Время замачивания семян, сут			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Контроль, вода	32 (100)	41 (129)	43 (136)	65 (207)	1,63 (100)	1,69 (104)	1,17 (72)	1,17 (72)	74 (100)	71 (96)	44 (59)	10 (14)
УФ 15 мин, вода	29 (93)	38 (121)	50 (157)	95 (300)	1,63 (100)	1,52 (92)	1,22 (75)	1,14 (70)	85 (115)	66 (89)	31 (42)	14 (19)
УФ 60 мин, вода	36 (114)	34 (107)	61 (193)	63 (200)	1,46 (90)	1,63 (100)	1,52 (92)	1,08 (66)	81 (109)	66 (89)	36 (49)	14 (19)
Этанол, 10 мМ	27 (86)	43 (136)	68 (214)	68 (214)	1,52 (92)	1,52 (92)	1,20 (74)	1,17 (72)	74 (100)	58 (75)	32 (43)	7 (9)
Строфантин 10 мкМ	38 (121)	47 (150)	63 (200)	54 (171)	1,75 (107)	1,40 (86)	1,20 (74)	1,05 (64)	83 (112)	63 (85)	37 (50)	16 (22)

(действию низкой и высокой температуры, микробам и др.). Полученные данные позволяют предложить наиболее оптимальную продолжительность замачивания семян в растворах БАВ — четыре часа. Замачивание семян в течение этого времени не наносит им существенного вреда и не влияет на посевные качества. Обработка семян пшеницы биологически активными веществами впервые два часа способствует повышению их всхожести. Полученные результаты могут быть рекомендованы для практического использования в сельскохозяйственном производстве для повышения урожайности и сопротивляемости семян и проростков пшеницы к действию неблагоприятных факторов среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В живых организмах протекают различные химические реакции среди которых следует выделить окислительно-восстановительные, продуктами этих реакций являются свободные радикалы. Для защиты от разрушительного действия свободных радикалов организмы используют компоненты антиоксидантной защиты в составе которых пероксидаза. Фермент способен катализировать оксидазные, оксигеназные и пероксидазные реакции. Сложное строение пероксидазы: полипептидная цепь, гемин, кальций и поверхностные моносахариды, последние защищают апобелок от разрушительного действия свободных радикалов. При этом моносахариды располагаются вдалеке от активного центра и не влияют на каталитические свойства пероксидазы, но способны ориентировать фермент в мембранных структурах клетки и ее органелл. Как представитель гемсодержащих белков, пероксидаза способна катализировать реакции с участием перекиси водорода, восстанавливая последнюю до воды и при этом окисляя различные неорганические и органические соединения. Продуктами ферментативной реакции могут быть свободные радикалы или фермент-субстратный радикальный комплекс, эффективно окисляющий даже медленно окисляемые в индивидуальных реакциях субстраты. Для выполнения разнообразных каталитических функций на поверхности холофермента располагается протяженная субстратсвязывающая площадка, представленная двумя участками, где могут связываться субстраты гидрофобной и гидрофильной природы. Причем в месте локализации гидрофобных субстратов проявляется карбоксильная группа, модификация которой замедляет протекание каталитического процесса. рК этой группы может колебаться в пределах 4,5–5,5.

Субстратами пероксидазы могут быть различные биологически активные соединения, поэтому основное предназначение фермен-

та заключается в осуществлении контрольных функций по поддержанию определенных концентраций функционально активных веществ в клетке, а также перекиси водорода и других активных форм кислорода. Кроме этого на пероксидазу возлагается иницирующая роль в системах, находящихся в состоянии покоя.

Покой является физиологически обусловленным состоянием в онтогенезе растений, за счет которого обеспечивается выживание вида в неблагоприятных условиях. В основе формирования механизмов покоя заложено функционирование различных физиолого-биохимических процессов. Контроль за этими процессами осуществляется комплексом функционально активных веществ, которые регулируют рост и развитие растительного организма, обеспечивая таким образом сохранение его жизнеспособности. Одним из компонентов механизмов покоя является антиоксидантная система (АОС), поддерживающая жизнеспособность организма при проявлении его минимальной функциональной активности. При этом компоненты АОС могут не только обеспечивать продолжительность состояния покоя, но и при создании благоприятных условий, активировать выход из состояния гипобиоза.

Ведущим звеном этой системы являются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), запускающие у покоящихся организмов основные процессы жизнедеятельности. Доказательствами этого утверждения служат следующие факты. При создании благоприятных условий (температура, влажность, кислород) семена могут прорасти. Однако предварительно у них должно активироваться дыхание. В покоящихся семенах дыхание крайне ослаблено, отмечаются изменения в составе жирных кислот и функционально активных веществ мембран митохондриальной системы, за счет которых обеспечивается разобщение механизмов окислительного фосфорилирования. Однако поступивший кислород активирует пусковые механизмы процессов ПОЛ. Контроль за этими процессами осуществляет антиоксидантная система, в составе низкомолекулярных (аскорбиновая кислота, гидрохинон, мочева кислота, мочевины, глутатион и др.) и высокомолекулярных (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза) соединений. Причем между компонентами системы просматривается взаимная зависимость. Особенностью механизма действия пероксидазы является способность фермента катализировать окисление органических субстратов с участием кислорода, т.е. фермент может выполнять роль оксидазы. Оксидазными субстратами фер-

мента служат индолил-3-уксусная кислота, диоксифумаровая кислота и др. Продуктами окисления в оксидазных реакциях являются супероксид анион-радикал (O_2^-) и катион-радикал ИУК, последний в кислой среде декарбоксилируется, превращаясь в радикал скатола. Радикалы скатола могут реагировать в дальнейшем с молекулярным кислородом, образуя перокси-радикалы и далее перекись скатола (Савицкий и др., 1998). Поэтому генерация свободных радикалов пероксидазой в оксидазных реакциях фермента может быть условием для его участия в процессах свободнорадикального окисления в семенах пшеницы, а фермент может выполнять роль инициатора образования свободных радикалов в семенах.

В круг пероксидазных субстратов фермента входят различные функционально активные вещества, в том числе и антиоксиданты. В реакциях индивидуального окисления эти соединения чаще всего являются медленно окисляемыми субстратами, однако при совместном окислении с быстро окисляемым субстратом скорость их пероксидазного окисления может возрастать в 100 и более раз. В ходе каталитического процесса могут образовываться свободные радикалы, которые в начальный момент прорастания семян способны инициировать реакции свободнорадикального окисления, активируя при этом протекание процессов перекисного окисления липидов. Высокие концентрации антиоксидантов ингибируют пероксидазу как в реакциях индивидуального, так и совместного окисления, осуществляя таким образом регуляторную функцию. Следует выделить ряд особенностей проявления активности пероксидазы в покоящихся и прорастающих семенах. Так, например, в сухих семенах выявляется высокая пероксидазная активность, коррелирующая с уровнем их жизнеспособности. Тогда как низкая активность фермента свидетельствует о понижении жизнеспособности и всхожести семян.

В условиях искусственного гипобиоза, вызванного длительным затоплением семян в воде, у них так же отмечается увеличение содержания антиоксидантов, сопровождающееся уменьшением уровня ПОЛ. Тогда как использование низких концентраций перекиси водорода, при набухании семян, в них повышается пероксидазная активность, коррелирующая с возрастанием их всхожести.

Набухание и прорастание семян сопровождается активированием ПОЛ, изменением в составе антиоксидантов и повышением активности пероксидазы в десятки раз. У непроросших семян

отмечается повышение содержания антиоксидантов, при пониженном уровне ПОЛ и пероксидазной активности. В прорастающих семенах происходит переключение дегидрогеназных реакций на аэробные, которые могут осуществляться с помощью эндогенных функционально активных веществ. Избирательность типов ингибирования пероксидазы ИУК обусловлена специализированностью ауксина служить оксидазным субстратом фермента. При этом ИУК может изменять направленность реакций пероксидазы с одного типа на другой, меняя специфичность фермента с пероксидазного на оксидазный, превращая пероксидазу в высокоспецифичную оксигеназу, генерирующую свободные радикалы, необходимость в которых может возникать у растений в процессе развития. Таким образом ИУК может выполнять роль «триггера» в реакциях окисления, катализируемых пероксидазой. Действие ауксина проявляется, например, при выходе семян пшеницы из состояния вынужденного покоя.

Предварительное УФ-облучение семян проявляется в резком увеличении активности пероксидазы, повышением уровня ПОЛ, с проявлением компенсаторного выброса высоких концентраций антиоксидантов в период прорастания. Наиболее активное возрастание содержания антиоксидантов и увеличения уровня ПОЛ отмечается в зародыше семян пшеницы, тогда как в щитке увеличение уровня ПОЛ сопровождается понижением антиоксидантной активности. Возможно, в этом проявляется регуляторный механизм, обеспечивающий нарушение избирательного транспорта функционально активных веществ через щиток. При этом из эндосперма в зародыш начинают активно поступать регуляторы роста, обеспечивающие прорастание зерновок пшеницы.

Субстратами пероксидазы могут быть и фитогормоны (абсцизовая кислота, гибберелловая кислота, ауксины и др.), поэтому фермент имеет важное значение в регуляции состава функционально активных веществ. Окисление этих функционально активных веществ ферментом способствует генерации свободных радикалов в семенах, а как следствие этого процесса является активизация ПОЛ. Вслед за этими процессами в семенах активизируется дыхание, повышается общий уровень метаболических процессов, что проявляется в ускоренном прорастании семян, активно выходящих из состояния покоя.

ЛИТЕРАТУРА

- Абрамов Ж.И., Оксенгендлер Г.И.* Человек и противокислительные вещества. Л.: Наука, 1985. — 230 с.
- Аверьянов А.А., Исмаилов А.И.* Участие супероксидного радикала в автоокислении госсипола // Биол. науки. — 1986. — № 5. — С. 76–78.
- Аверьянов А.А., Лапикова В.П., Умнов А.М., Джавахия В.Г.* Генерация листьями риса радикала O_2^- в связи с устойчивостью к перикюльриозу // Физиология растений. — 1987. — Т. 34. — № 2. — С. 373–379.
- Аверьянов А.А., Лапикова В.П.* Фунгитоксичность выделений листьев риса, обусловленная активными формами кислорода // Физиология растений. — 1988а. — Т. 35. — № 6. — С. 1142–1151.
- Аверьянов А.А., Лашкова В.П.* Генерация кислородных радикалов фенольными соединениями в связи с иммунитетом растений // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. Рига: Из-во Рижского мед. ин-та, 1988б. С. 203.
- Азамасцев А.П., Яскина Д.С.* Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ. М.: Наука, 1975. — 340 с.
- Аммосова Т.Н., Упоров И.В., Рубцова М.Ю., Игнатенко О.В., Егоров А.М., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И.* Антигенное картирование пероксидазы хрена (изофермент С) // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — № 4. — С. 516–524.
- Андреева В.А.* Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. — 129 с.
- Андреанова Ю.Е., Бакуридзе П.Л.* Влияние ретиноидов и этилового спирта на прорастание семян // Известия РАН. Серия биологич. — 1996. — № 5. — С. 565–570.
- Аристархова С.А., Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б.* Регуляторная роль взаимосвязи изменений в концентрации антиоксидантов в составе липидов клеточных мембран // Докл. АН СССР. — 1976. — Т. 228. — № 1. — С. 215–218.
- Бабаев М.Ш.* Контроль за спонтанными и индуцированными типами мутирования хромосом растений биоантиоксидантами // Современные проблемы, теории химического мутагенеза. — Таллинн, 1987. — С. 34–37.
- Баландина Г.Н., Лысогорская Е.Н., Морозова Е.А., Степанов В.М.* Окрашенный водорастворимый карбодимид как реагент для модификации белков // Химия природн. соединен. — 1975. — Т. 11. — № 2. — С. 198–201.
- Барабай В.А.* Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984. — 160 с.
- Батыгина Т.Б.* Хлебное зерно. Атлас. — Л.: Наука, 1987. — С. 29–49.
- Беликов В.Г.* Фармацевтическая химия. М.: Высшая школа, 1985. — 768 с.

Белоконева О.С., Мальцева Е.Л., Зайцев С.В., Пальмина Н.П. Инактивация связывания налоксона с опиоидными рецепторами мембран головного мозга крыс // Биохимия. — 1993. — Т. 58. — № 12. — С. 1945–1958.

Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М:МГУ, 1976. — С.111–114.

Березин И.В., Угарова Н.Н., Кершенгольц Б.М., Бровко Л.Ю. Влияние простетической группы пероксидазы из хрена на стабильность фермента//Биохимия. — 1975а. — Т. 40. — № 2. — С. 297–301.

Березин И.В., Угарова Н.Н., Дмитриева—Гетлинг М.П., Кершенгольц Б.М. Кинетика и механизм действия пероксидазы из хрена в реакции окисления диоксифумаровой кислоты кислородом воздуха // Биохимия. — 1975б. — Т. 40. — № 3. — С. 475–483.

Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1990. — 528 с.

Богатский А.В., Назарова Н.Ю., Кинтя П.К. Модификация бислойных липидных мембран среди стероидных гликозидов // Докл. АН СССР. — 1960. — Т. 252. — № 1. — С. 235–237.

Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М., Пальмина Н.М., Храпова Н.Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука, 1975. — 241 с.

Бурлакова Е.Б. Свободнорадикальный механизм регуляции клеточного метаболизма и его связь с другими регуляторными системами. — В сб.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. М.: Наука, 1976. — С. 18–19.

Бурлакова Е.Б., Аристархова С.А., Федорова Л.Ф. Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. Особенности влияния дипальмитоилфосфатидилхолина и его структурных фрагментов на перекисное окисление липидов биологических мембран//Биол. науки. — 1991. — № 9. — С. 21–27.

Вартанян Л.С., Садовникова И.П., Гуревич С.М., Соколова И.С. Образование супероксидных радикалов в мембранах субклеточных органелл регенерирующей печени // Биохимия. — 1992. — Т. 57. — № 5. — С. 671–678.

Вербов В.Н. Принципы твердофазного иммуноферментного анализа//Твердофазный иммуноферментный анализ/Под ред. Ф.С. Носкова. Тр. ин-та им. Пастера. Л.: Изд-во ин-та им. Пастера, 1986. — С. 3–27.

Верболович В.П., Подгорный Ю.К., Подгорная Л.М. Значение антиокислительных ферментов в регуляции перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов человека // Биологические науки. — 1989. — № 1. — С. 27–33.

Верхотуров В.В. Взаимное влияние пероксидазы и низкомолекулярных антиоксидантов на прорастание семян пшеницы. Автореф. дис. канд. биол. наук. — Иркутск, 1999. — 23 с.

Веселова Т.В., Веселовский В.А., Леонова Е.А. Что означает изменение гетерогенности популяции семян при ускоренном старении? // Физиология растений. — 1999. — Т. 46. — № 3. — С. 477–483.

Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран // Биофизика. — 1987. — Т. 32. — № 5. — С. 830–844.

Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. — 252 с.

Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. — 544 с.

Дроздов С.Н., Курец В.К., Титов А.Ф. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Б.и., 1984. — 168 с.

Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи соврем. биологии. — 1993. — Т. 113. — № 1. — С. 71–81.

Евстигнеева Р.П., Рожкова Е.А., Желтухина Г.А., Лыско А.И., Лукьянова Л.Д. Геминпептиды, проявляющие пероксидазную активность // Докл. АН. — 1995. — Т. 342. — № 3. — С. 407–409.

Еремин А.Н., Литвинчук А.В., Метелица Д.И. Операционная стабильность каталазы и ее конъюгатов с альдегиддекстранами и супероксиддисмутазой // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 4. — С. 664–679.

Ефимов Д.Е., Науменко В.Г. Активность перекисного окисления липидов в условиях гипертрофической и токсической кардиомиопатии у крыс разного возраста // Тез. и реф. докл. съезда геронтол. и гериатров. УССР (Днепропетровск, 4–6 окт. 1988), Киев. — С. 80.

Заводник И.Б., Лапшина Е.А. Процессы окисления гемоглобина человека // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 1. — С. 42–48.

Запаметов М.Н., Ермакова С.А., Арзуманян В.Т. Мембрансвязанные ферменты биосинтеза фенольных соединений. Активность микросомальных 4-гидроксилазы транс-коричной кислоты и фенилаланил-аммиаклиазы на ранних стадиях развития проростков ячменя // Биохимия. — 1985. — Т. 50. — № 7. — С. 302–311.

Зауралов О.А., Колмыкова Т.С., Лукаткин А.С. Влияние продолжительности предпосевной обработки семян регуляторами роста на прорастание и содержание в них фитогормонов // Сельскохозяйственная биология. — 1997. — № 1. — С. 80–84.

Зелинский Г.В. Периодические колебания всхожести, силы роста и активности протеиназ семян сои при различных режимах их длительного хранения // Физиология и биохимия культ. растений. — 1989. — Т. 21. — № 5. — С. 469–474.

Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113. — № 3. — С. 286–296.

Иванова Д.Г., Гужова Н.В., Мерзляк М.Н. Генерация радикалов кислорода в различных типах взаимодействия картофеля с возбудителем фитофтороза // Физиология растений. — 1991. — Т. 38. — № 2. — С. 281–285.

Иванова З.А., Вафина Г.Х. Физиологическая роль пероксидазной активности клеточных ядер на ранних этапах онтогенеза растений // Физиология и биохимия культ. растений. — 1997. — Т. 29. — № 2. — С. 129–132.

Иванова Т.М., Рубин Б.А. О природе фенолоксидазного действия пероксидазы // Биохимия. — 1962. — Т. 27. — № 4. — С. 622–630.

Иванова Т.М., Рубин Б.А. Об окислении кодегидразы I пероксидазой // ДАН СССР. — 1963. — Т. 150. — № 2. — С. 414–416.

Игнатенко О.В., Рубцова М.Ю., Чередникова Т.В., Упоров И.В., Егоров А.М. Использование моноклональных антител для характеристики антигенных свойств пероксидазы хрена // Биохимия. — 2003. — Т. 68. — № 2. — С. 235–242.

Ильинская Л.И., Васюкова Н.И., Озерецковская О.А. Биохимические аспекты индуцированной устойчивости и восприимчивости растений. — М.: ВИНТИ (Итоги науки и техники. Сер.Защита растений), 1991. — 196 с.

Иммуноферментный анализ / Под ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхоффа. М.: Мир, 1988. — 135 с.

Калинин Ф.Л. Теоретические основы управления ростом, развитием и продуктивностью растений эндогенными и экзогенными факторами // Физиология и биохимия культ. растений. — 1986. — Т. 18. — № 6. — С. 537–555.

Канцерогенные вещества. Справочник / Пер. с англ. под ред. В. С. Турусова. М.: Медицина, 1987.

Качурин А.М., Кропачев Е.В., Иоганнсен М.Г., Петров А.С. Особенности пероксидазного окисления амидопирина и его аналогов // Биохимия. — 1991. — Т. 56. — № 10. — С. 1768–1778.

Каюшин Л.П., Грибова З.П., Азизова О.А. Электронный парамагнитный резонанс фотопроцессов биологических соединений. М.: Наука, 1973. — 304 с.

Каюшин Л.П., Львов К.М., Пулатова М.К. Исследование парамагнитных центров облученных белков. М.: Наука, 1970. — 263 с.

Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи соврем. биологии. — 1993. — Т. 113. — № 4. — С. 456–470.

Кинтя П.К., Бурцева Е.А., Ковальчук Л.П. Поиск антиоксиданта в ряду стероидных гликозидов // Химико-фарм. журн. — 1982. — № 1. — С. 95–97.

Ким Б.Б. Моноклональные антитела в исследовании ферментов. В кн.: Итоги науки и техники. Биотехнология. — М.: ВИНТИ. — 1989. — Т. 20. — С. 97–132.

Климов С.В. Биоэнергетическая концепция устойчивости растений к низким температурам // Успехи соврем. биологии. — 1997. — Т. 117. — № 2. — С. 133–154.

Клячко Н.Л. Регуляция ферментов структурой и природой матрицы в микротерогенных системах на основе агрегатов поверхностно-активных веществ. Дисс. док. хим. наук. М.: МГУ, 1990. — 223 с.

Клячко Н.Л., Дулькис Ю.К., Сухорученко Т.А., Левашов А.В. Стабильность и стабилизация рекомбинантной пероксидазы в системе обращенных мицелл // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — № 3. — С. 394–399.

Клячко О.С., Полосухина Е.С., Озернюк Н.Д. Температура вызывает структурные и функциональные изменения лактатдегидрогеназы из скелетных мышц рыб // Биофизика. — 1993. — Т. 38. — № 4. — С. 596–601.

Коган А.Х., Кудрин А.Н., Кактурский Л.В., Лосев Н.И. Свободнорадикальные перекисные механизмы патогенеза ишемии и инфаркта миокарда // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1992. — № 2. — С. 5–15.

Коган А.Х., Грачев С.В., Елисеева С.В., Болевич С. Углекислый газ — универсальный ингибитор генерации активных форм кислорода клетками // Известия АН. Серия биологическая. — 1997. — № 2. — С. 204–217.

Колупаев Ю.Е., Трунова Т.И. Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стрессов // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1992. — Т. 24. — № 6. — С. 523–531.

Ком В. Железопорфирины — гемы и гемины. — В кн.: Неорганическая биохимия / Под ред. Г.Эйхгорн. М.: Мир, 1978, Т. 2. — С. 218–470

Кричевская А.А. Нейрохимия. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1977. — 224 с.

Кутузова Г.Д. Влияние химической модификации функциональных групп ферментов на их структуру и стабильность. Дис. канд. хим. наук. — Москва, 1981. — 159 с.

Кутузова Г.Д., Рогожин В.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Функционально важные карбоксильные группы пероксидазы хрена // Доклады АН СССР. — 1983. — Т. 270. — № 4. — С.994–998

Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н. Стабилизация пероксидазы хрена при ацетилировании фермента и в присутствии ионов кальция // Биоорганич. химия. — 1981. — Т. 76. — № 1. — С. 75–85.

Куч Д. Иммунизация тыквенных против грибных, бактериальных и вирусных болезней // Инфекционные болезни растений: Физиологические и биохимические основы / Под ред. Дьякова Ю.Т. М.: Агропромиздат, 1985. — С. 150–168.

Лебедева О.В. Кинетика и механизм взаимодействия гемсодержащей пероксидазы с органическими субстратами и физиологически активными веществами. Автореф. дис. канд.хим. наук. — М., 1980. — 16 с.

Лебедева О.В., Угарова Н.Н. Механизм пероксидазного окисления. Субстрат — субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена // Изв. РАН. Серия химич. — 1996. — № 1. — С. 25–32.

Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Кинетическое изучение реакции окисления *o*-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена // Биохимия. — 1977. — Т. 42. — № 8. — С. 1372–1379.

Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Совместное окисление ферроцианида калия и *o*-дианизидина перекисью водорода, катализируемое пероксидазой хрена. Субстрат-субстратная активация // Биохимия. — 1981. Т. 46. — № 7. — С. 1202–1209.

Лебедева О.В., Угарова Н.Н. Стационарная кинетика реакции окисления NADH пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — № 2. — С. 249–253.

Левашов А.В. Катализ ферментами в системах обращенных мицелл. Автореф. дисс. доктора хим. наук. М., 1987. — 45 с.

Лукатин А.С. Перекисное окисление липидов у растений проса при действии пониженных температур / В кн.: Физиология устойчивости растений и регуляторов роста. Саранск, 1987. — С. 31–36.

Лукатин А.С., Шаркаев Э.Ш., Зауралов О.А. Изменения перекисного окисления липидов в листьях теплолюбивых растений при различной длительности холодового стресса // Физиология растений. — 1995. — Т. 42. — № 4. — С. 607–611.

Львов К.М., Львова О.Ф. Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. М.: Наука, 1988. — С. 41–55.

Макинен М. Структурные и электронные аспекты ионов металлов в белках. В кн.: Методы и достижения биоорганической химии / Под ред. Маколифф К.М.: Мир, 1978. — С.11–124.

Максимов И.В. Изучение факторов устойчивости пшеницы и эгилопса к септориозу // Дис. канд. биол. наук. СПб:ВИЗР, 1994, 21 с.

Максимов И.В., Хайфуллин Р.М., Ямалеев А.М., Ямалеева А.А. Использование биополимера хитина для разделения изоферментов пероксидазы пшеницы // Вопросы биотехнологии / Под ред. Р.Р. Ахметова. Уфа:Изд-во БГУ, 1995. — С. 120–127.

Максютов А.З., Загребельный С.Н. Антигенные детерминанты белков. Гуморальный иммунный ответ // Мол. биология. — 1993. — Т. 27. — № 5. — С. 980–991.

Мальцева Е.Л., Курнакова Н.В., Бурлакова Е.Б., Пальмина Н.П. Кинетическая кооперативность при ингибировании активности протеинкиназы с диеновыми конъюгатами из фосфолипидов и арахидоновой кислоты *in vitro* // Биохимия. — 1990. — Т. 50. — № 3. — С. 471–479.

- Матусис И.И.* Витамин С (аскорбиновая кислота) // Витамин / Под ред. М.И. Смирнова. М.: Медицина, 1974. — С. 384–414.
- Матяш Л.Ф., Оглоблина О.Г., Степанов В.М.* Изучение реакции пепсина с водорастворимыми карбодиимидами и окрашенным амином // Биохимия. — 1972. — Т. 37. — № 5. — С. 1067–1073.
- Машковский М.Д.* Лекарственные средства. Т. 1, 2. М.: Медицина, 2002.
- Меерсон Ф.З.* Основные закономерности индивидуальной адаптации. В сб.: Физиология адаптационных процессов. М.: Наука, 1986. — С. 10–76.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.* Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113. — № 4. — С. 442–455.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.* Окислительный стресс при воспалении // Успехи соврем. биологии. — 1997. — Т. 117. — № 2. — С. 155–171.
- Мерзляк М.Н., Румянцев В.Б.* «Пигменты старения» в растительных клетках: накопление в отдельных от растения листьях гороха // Докл. АН СССР. — 1981. — Т. 256. — № 6. — С. 1264–1267.
- Мерзляк М.Н., Соболев А.С.* Роль супероксидных анион-радикалов и синглетного кислорода в патологии мембран. В кн.: Молекулярная патология мембранных структур // Итоги науки и техники. Биофизика. — Т. 5. М.: ВИНТИ. 1975, С. 118.
- Мезляк М.Н.* Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНТИ, 1989. Т. 6. — 34 с.
- Метелица Д.И.* Моделирование окислительно-восстановительных ферментов // Минск. Наука и техника, 1984.
- Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышиников В.С.* Иницирование и ингибирование радикальных процессов в системах H_2O_2 -метмиоглобин (мет-гемоглобин)-2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоукислота) // Биохимия. — 2001. — Т. 66. — № 5. — С. 628–639.
- Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л.* Биохимия иммунитета, покоя, старения растений. М.: Наука, 1984. С. 16.
- Минибаява Ф.В., Рахматулина Д.Ф., Гордон Л.Х., Вылегжанина Н.Н.* Роль супероксидов в формировании неспецифического адаптационного синдрома корневых клеток // Доклады АН. — 1997. — Т. 355. — № 4. — С. 554–556.
- Михалик О.М., Шевченко А.И., Островская Л.К.* Фотосинтетический транспорт электронов в хлоропластах люпина в норме и при патологии, связанной с дефицитом железа // Биохимия. — 1988. — Т. 53. — № 7. — С. 1181–1187.
- Михно А.Н., Минакова С.Г., Харченко Л.В.* Влияние предпосевной обработки семян биологически активными веществами на полевую всхожесть и развитие проростков сахарной свеклы // Физиология и биохимия культ. растений. — 1997. — Т. 29. — № 2. — С. 107–114.
- Мишанин Ю.Ф., Дорошкевич Н.А., Анцупевич С.Н.* Активность перекисного окисления липидов при кардиомиопатии телят // С.-х. биология. — 1992. — № 2. — С. 94–99.
- Мишарин С.И., Антипина А.И., Войников В.К.* Влияние холодового шока на антигенный состав озимой ржи и пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 1997. — Т. 29. — № 3. — С. 215–219.
- Моисеева С.А., Постникова Г.Б.* Механизм окисления оксимиоглобина ионами меди: сравнение миоглобинов кашалота, лошади и свиньи // Биохимия. — 2001. — Т. 66. — № 7. — С. 959–967.

Мухин В.П., Спиридонов Ю.Я., Мищенко Л.Н. Действие симазина на растения яровой пшеницы и ячменя, выращенные из матрикально разнокачественных семян // Известия ТСХА. — 1993. — № 3. — С. 13–29.

Нариманов А.А., Корыстов Ю.Н. К механизму повышения всхожести семян ячменя перекисью водорода в условиях переувлажнения // Изв. РАН. Сер. биол. — 1998. — № 1. — С. 110–114.

Наумова О.В., Гончаренко Е.Н., Деев Л.И. Влияние карнозина на ферментативные системы печени в облученном организме // Биохимия. — 1992. — Т. 57. — № 9. — С. 1372–1377.

Негру П.В., Медведева Т.Н. Электрофоретические спектры легкорастворимых белков, пероксидазы и о-дифенолоксидазы в связи с зимостойкостью винограда // Физиология и биохимия культ. растений. — 1990. — Т. 22. — № 5. — С. 469–476.

Негру П.В., Медведева Т.Н., Кожокару В.А. Эколого-физиологические механизмы морозоустойчивости винограда. — Кишинев: Штиинца, 1988. — 196 с.

Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по прорастиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. — 347 с.

Обручева Н.В., Антипова О.В. Физиология инициации прорастания семян // Физиол. растений. — 1997. — Т. 44. — № 2. — С. 287–302.

Обручева Н.В., Антипова О.В. Общность физиологических механизмов подготовки к прорастанию у семян с различным типом покоя // Физиология растений. — 1999. — Т. 46. — № 3. — С. 426–431.

Островская Л.К. Супероксидный радикал при дефиците металла и синдромах хлороза // Физиология и биохимия культ. растений. — 1993. — Т. 25. — № 2. — С. 103–113.

Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Курнакова Н.В., Бурлакова Е.Б. Влияние а-токоферола в широком спектре концентраций на активность протеинкиназы С. Связь с пролиферацией и опухолевым ростом // Биохимия. — 1994. — Т. 59. — № 2. — С. 193–200.

Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. — 1995. — Т. 37. — № 1. — С. 66–72.

Пахомова В.М., Чернов И.А. Некоторые особенности индуктивной фазы неспецифического адаптационного синдрома растений // Известия РАН. Серия биологическая. — 1996. — № 6. — С. 705–715.

Петрова О.В., Мишустина П.С. Изоферменты пероксидазы в листьях кукурузы при пониженных температурах // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1976. — Т. 8. — № 2. — С. 174–177.

Плетнева Н.Г. Химики — микроскопические методы исследования биологических материалов // Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. — С. 68.

Плешков Б.П. Биохимия сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. — 494 с.

Поберезкина Н.Б., Задорина О.В., Андриюшенко П.И., Хмелевский Ю.В. Роль процессов перекисного окисления и антиоксидантной защиты при нитритной гипоксии и ее коррекции витаминами // Укр. биохим. ж. — 1992. — Т. 64. — № 6. — С. 64–70.

Полак Д., Ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир, 1987.

- Полевой В.В. Физиология растений. М.: Высш.шк., 1989. — 464 с.
- Прайор У. Роль свободнорадикальных реакций в биологических системах. В кн.: Свободные радикалы в биологии. М.: Мир, 1979. — С. 13–67.
- Пратт Д. Основы катализа металлоферментами. В кн.: Методы и достижения биоорганической химии / Под ред. К.М. Маколифф. М: Мир, 1978. — С. 133–253.
- Пучкаев А.В., Метелица Д.И. Окисление люминола в бездетергентных микроэмульсиях (гексан-изопропил-вода), катализируемое пероксидазой хрена или гемом // Биохимия. — 1993. — Т. 58. — № 10. — С. 1538–1547.
- Рамазанова Л.Х., Мифтахутдинова Ф.Г., Алексеева В.Я. К вопросу об активном центре оксидазной функции пероксидазы // Биохимия. — 1971. — Т. 36. — № 1. — С. 67–71.
- Реймерс Ф.Э. Растение во младенчестве. Новосибирск: Наука, 1987. — 181 с.
- Роговина В.В., Муравьева Р.А., Фомина В.А., Муштакова В.М. Пероксидазосомы клеток растений // Изв. РАН. Сер. биол. — 1996. — № 1. — С. 16–22.
- Рогожин В.В. Роль карбоксильных и гуанидиновых групп в функционировании пероксидазы хрена. Дисс. канд. хим. наук, МГУ, Москва. 1984. — 200 с.
- Рогожин В.В. Возможные механизмы регулирования активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы избытком субстрата и кофермента // Биоорг. химия. — 1996. — Т. 23. — № 8. — С. 575–579.
- Рогожин В.В. Перекисное окисление липидов является инициатором пусковых механизмов прорастания семян // Тезисы докладов IX Международного симпозиума по кормовым растениям «Эколого-популяционный анализ кормовых растений естественной флоры, интродукция и использование». (17–20 августа 1999). Коми, Сыктывкар, 1999. С. 170–171.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Аскорбиновая кислота — медленно окисляемый субстрат пероксидазы хрена // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — № 12. — С. 1678–1682.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Стационарная кинетика пероксидазного окисления 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазина в присутствии пероксидазы хрена // Биохимия. — 1998а. — Т. 63. — № 5. — С. 661–666.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Влияние функционально активных веществ на пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты и о — дианизидина, катализируемого пероксидазой хрена // Наука и образование. — 1998б. — № 4. — С. 21–26.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Влияние антиоксидантов (дигоксина, кверцетина и аскорбиновой кислоты) на каталитические свойства пероксидазы хрена // Биохимия. — 1998в. — Т. 63. — № 6. — С. 781–786.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Механизм угнетения активности пероксидазы салицилатом натрия // Наука и образование. — 1999а. — № 1. — С. 45–48.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Стационарная кинетика совместного окисления аскорбиновой кислоты и ферроцианида калия перекисью водорода в присутствии пероксидазы хрена // Биоорг. химия. — 1999б. — Т. 25. — № 1. — С. 70–73.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Стационарная кинетика совместного пероксидазного окисления гидрохинона и о — дианизидина в присутствии пероксидазы хрена // Биохимия. — 1999в. — Т. 64. — № 2. — С. 219–224.
- Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Механизм совместного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона в присутствии пероксидазы хрена // Биоорг. химия. — 1999. — Т. 25. — № 5. — С. 377–382.

Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Курилюк Т.Т., Охлопкова Е.П. Влияние температуры, ультрафиолетового излучения и функционально активных веществ на всхожесть семян пшеницы // Известия ТСХА. — 1999. — № 3. — С. 105–124.

Рогожин В.В., Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н., Березин И.В. Спектрофотометрическое определение числа доступных карбоксильных групп в белках с помощью *о*-данизидина и водорастворимого карбодиимида. Влияние функционально важных карбоксильных групп в пероксидазе хрена // Биоорг. химия. — 1983. — № 6. — Т. 9. — С. 794–802.

Рогожин В.В., Егорова П.С. Влияние экзогенных этанола и ацетальдегида на жизнеспособность семян пшеницы // В сб. научн. трудов «Этанол и его метаболизм в высших организмах». Якутск: Из-во. ЯНЦ СО АН СССР. — 1991. — С. 90–99.

Рогожин В.В., Курилюк Т.Т. Влияние ультрафиолетового облучения семян на процессы перекисного окисления липидов в проростках пшеницы // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 8. — С. 1432–1439.

Рогожин В.В., Курилюк Т.Т. Влияние малых доз ультрафиолетового облучения семян на состояние антиоксидантной системы, прорастающих зерен пшеницы // Известия ТСХА. — 1999. — № 4. — С. 96–105.

Рогожин В.В., Курилюк Т.Т., Филиппова Н.П. Антиоксидантная активность проростков после ультрафиолетового облучения семян пшеницы // Наука и образование. — 1997. — № 4. — С. 91–97.

Рогожин В.В., Курилюк Т.Т., Филиппова Н.П. Изменение реакции антиоксидантной системы проростков пшеницы после ультрафиолетового облучения семян // Биофизика. — 2000а. — Т. 45. — № 4. — С. 730–736.

Рогожин В.В., Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н. Ингибирование пероксидазы 3-этил-амидом *о*-сульфобензойлуксусной кислоты // Биоорганич. химия. — 2000б. — Т. 26. — № 2. — С. 156–160.

Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Влияние строфантина G на кинетику пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов пероксидазы // Биохимия. — 2000. — Т. 65. — № 5. — С. 657–664.

Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Изучение пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии индолил-3-уксусной кислоты. Электронный журнал «Исследовано в России», 111, стр. 1212–1225, 2002 г. <http://zhurnal.apc.reln.ru/articles/2002/111.pdf>

Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Стационарная кинетика индивидуального и совместного окисления фенотиазинов в присутствии пероксидазы хрена. Электронный журнал «Исследовано в России», 70, стр. 768–780, 2002 г. <http://zhurnal.apc.reln.ru/articles/2002/070.pdf>

Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на окисление *о*-данизидина и гидрохинона в присутствии пероксидазы // Электронный журнал «Исследовано в России», 81, стр. 919–933, 2003 г. <http://zhurnal.apc.reln.ru/articles/2003/081.pdf>

Рошупкин Д.И. Молекулярные механизмы повреждения биомембран, липидов и белков под действием ультрафиолетового излучения. Докт. дис. М., 1980. — 344 с.

Рошупкин Д.И., Мурина М.А. Фотобиологические процессы в биомембранах при действии ультрафиолетового излучения на клетки, ткани и органы животных // Биофизика. — 1993. — Т. 38. — № 6. — С. 1053–1068.

Рубин Б.А. О биохимических механизмах антимикробного иммунитета растений // Биол. науки. — 1966. — № 2. — С. 7–12.

Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. Биохимия и физиология иммунитета растений. М.: Высш. школа, 1975. — 320 с.

Ругге Э.К., Блюменфельд Л.А. Свободные радикалы аскорбиновой кислоты, возникающие при взаимодействии с белками // Биофизика. — 1965. — № 10. — С. 689—695.

Рудышин С.Д. Исследование легкорастворимых белков и пероксидазы листьев в связи с устойчивостью виноградного растения // Виноделие и виноградарство СССР. — 1983. — № 3. — С. 43—45.

Савицкий А.П. Исследование структуры активного центра гемсодержащей пероксидазы спектрально-люминесцентным методом. Автореф. канд. дис. М., 1979. — 16 с.

Савицкий А.П., Угарова Н.Н., Березин И.В. Роль гема в формировании третичной структуры пероксидазы из хрена. Взаимосвязь между флуоресценцией и третичной структурой фермента // Биоорг. химия. — 1977. — Т. 3. — № 9. — С. 1242—1249.

Савицкий П.А., Рожкова А.М., Тишков В.И., Упоров И.В., Руденская Г.Н., Газарян И.Г. Существование центра связывания индоллил-3-уксусной кислоты в пероксидазах растений. Структурное сходство пероксидаз и ауксин — связывающих белков // Биохимия. — 1998. — Т. 63. — № 6. — С. 749—754.

Саксонов М.Н., Стом Д.И., Акимова Г.П., Нечаева Л.В. Смесь пирокатехин-резорцин в качестве донора водорода при определении активности пероксидазы // Физиол. и биохимия культ. раст. — 1993. — Т. 25. — № 5. — С. 509—513.

Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А. Иерархия радиотаксонов и эволюция генома // Радиобиология. — 1988. — Т. 28. — № 2. — С. 160—165.

Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А. Генетическая природа феномена радиационной устойчивости клетки // Радиобиология. — 1991. — Т. 31. — № 1. — С. 593—600.

Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А., Иванова Г.А. Видовая радиорезистентность растений в фазах вегетации и покоящихся семенах // Радиобиология. — 1989а. — Т. 29. — № 4. — С. 506—510.

Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А., Корнеев Н.А. Соприженность биохимического и радиационного полиморфизма у гексаплоидной пшеницы // Доклады АН СССР. — 1989б. — Т. 306. — № 3. — С. 736—738.

Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло // Соросовский Образовательный Журнал. — 1996. — № 3. — С. 4—10.

Сова В.В., Еляева Л.А. Влияние реагентов, взаимодействующих с карбоксильными группами, на α -1,3-глюканазу из *Spisula Sachalinens* // Биорг. химия. — 1978. — Т. 4. — № 11. — С. 1547—1552.

Солдатова А.М., Воскресенский О.Н. Витамины антиоксидантного действия и возрастная дистрофия сетчатки // Вопр. мед. химии. — 1994. — Т. 40. — № 2. — С. 2—6.

Стетуро И.И., Чайковская Н.А., Водоевич В.П., Виноградов В.В. Восстановление метгемоглобина и феррицитохрома с гликозилированными аминокислотами и альбумином // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — № 9. — С. 1130—1136.

Строев Е.А. Биологическая химия. М.: Высш. шк., 1986. — С. 44—45.

Тарусов Б.Н. Основы биологического действия радиоактивных излучений. М.: Медгиз, 1954. — 130 с.

Тумов А.Ф. Молекулярно — генетический подход к проблеме терморезистентности растений. В кн.: Эколого-физиологические механизмы устойчивости растений к действию экстремальных температур. Петрозаводск, 1978. — С. 14—19.

Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Петров В.А. Калориметрическое исследование окисления аскорбиновой кислоты пероксидазой хрена // Биофизика. — 1992. — Т. 37. — № 1. — С. 17–22.

Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкость растений. М., 1979. — 350 с.

Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. — М.: Мир, 1981. Т. 1. С. 261–266.

Угарова Н.Н. Применение ферментов в химическом анализе // Введение в прикладную энзимологию. Учебное пособие / Под ред. И.В. Березина, К. Мартина. — М.: Изд-во МГУ, 1982. — С. 306–342.

Угарова Н.Н., Лебедева О.В. Структура и функция пероксидазы из хрена // Биохимия. — 1978. — Т. 43. — № 10. — С. 1731–1742.

Угарова Н.Н., Рожкова Г.Д., Васильева Т.Е., Березин И.В. Химическая модификация ϵ -NH₂- групп остатков лизина в пероксидазе из хрена. Доступность этих групп различным модифицирующим агентам // Биохимия. — 1978а. — Т. 43. — № 5. — С. 793–797.

Угарова Н.Н., Рожкова Г.Д., Березин И.В. Химическая модификация ϵ -NH₂- групп лизина в пероксидазе из хрена. Влияние ее на каталитические свойства и пространственную структуру фермента // Биохимия. — 1978б. — Т. 43. — № 7. — С. 1242–1250.

Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П. Пероксидазный катализ и его применение. М.: МГУ, 1981. — 92 с.

Угарова Н.Н., Кутузова Г.Д., Рогожин В.В., Савицкий А.П., Скирда Л.А. Химическая модификация пероксидазы хрена водорастворимыми карбодиимидами и нуклеофилами. Роль доступных карбоксильных групп в пероксидазном катализе // Биоорганическая химия. — 1982. — Т. 8. — № 9. — С. 1180–1188.

Упоров И.В., Егоров А.М. Моделирование пространственной структуры пероксидазы хрена (изофермент С) // Докл. РАН. — 1997. — Т. 356. — № 5. — С. 696–699.

Формазюк В.Е., Щило В.В. Роль перекисного окисления липидов биомембран в патологии (молекулярные аспекты). ВИНТИ, М., 1985, № 2961 — 85.

Хайруллин Р.М., Юсупова З.Р., Максимов И.В. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. 1. Взаимодействие анионных пероксидаз пшеницы с хитином, хитозаном и теллспорами *Tilletia caries* // Физиол. растений. — 2000а. — Т. 47. — № 1. — С. 108–113.

Хайруллин Р.М., Юсупова З.Р., Трошина Н.Б. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. 2. Активация анионных изоформ пероксидазы в проростках пшеницы при инфицировании спорами *Tilletia caries* // Физиол. растений. — 2000б. — Т. 47. — № 1. — С. 108–113.

Чуахина Г.Н., Залыцева М.В., Сивцова А.М. Количественная локализация аскорбиновой, дегидроаскорбиновой и дикетоглуконовой кислот в листьях ячменя в связи с освещением // Фотосинтез и продуктивность растений. Калининград: Калинингр. ун-т, 1987. — 96 с.

Шевченко Н.В., Погосян С.И., Мерзляк М.Н. Перекисное окисление мембранных липидов при действии на растения галоид-феноксикислот // Физиология растений. — 1980. — Т. 27. — № 2. — С. 363–369.

Шемакин М.И., Хохлов А.С., Колосов М.Н., Бергельсон Л.Д., Антонов В.К. Химия антибиотиков. М.: Из-во АН СССР, 1961. — 501 с.

Шервуд Р.Т., Вэнс К.П. Первичные изменения в клеточных стенках эпидермиса при проникновении паразита / Инфекционные болезни растений: Физиологические и биохимические основы / Под ред. Дьякова Ю.Т. М.: Агропромиздат, 1985. — С. 34–54.

Шерстнев К.Б., Сулейманов А.К. Белки мембран синапсом головного мозга крыс при судорогах, вызванных повышенным давлением кислорода // Вопр. мед. химии. — 1986. — № 4. — С. 35–37.

Шибато К. Доступность для реагентов и окружения аминокислотных остатков в нативных белках. — В кн.: Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Ред. А. Нидервайзера, Г. Патаки. М.: Мир, 1974. — С. 344–386.

Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. М.: Наука, 1968. — 451 с.

Якушкина Н.И. Физиология растений. М.: Просвещение, 1993. — 335 с.

Abadan Y., Chu K., Chien E., Frauenfelder H., Nienhaus G.U., Sligar S.G., Young R.D. Infrared studies of proximal — side mutants of myoglobin // Biophys. J. — 1994. — Vol. 66. — N 2, Pt. 2. — С. 360.

Acosta M., Casas J.L., Arnao M.B., Sabater F. Aminocyclopropane-1-carboxylic acid as a substrate of peroxidase: conditions for oxygen consumption, hydroperoxide generation and ethylene production // Biochim. et Biophys. Acta. Protein Struct. And Mol. Enzymol. — 1991. — Vol. 1077. — N 3. — P. 273–280.

Adam A., Bestwek C.S., Mansfield I.W. Changes in the activity of antioxidant enzymes during the bacterially induced hypersensitive response of bean plants // 1st International conference «Oxygen and environmental stress in plants». Univ. of St. Andrews, Sept. 6–10, 1993. — С. 70.

Adam A., Farkas T., Hevesi M., Kirali Z. Consequence of O₂-generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids // Physiol. Molec. Plant Pathol. — 1989. — V. 34. — N 1. — P. 13–19.

Amiconi G., Antonini E., Brunori M., Formanek H., Huber R. Functional properties of native and reconstituted haemoglobins from *Chironomus thummi* // Eur. J. Biochem. — 1972. — Vol. 31. — N 1. — P. 52–62.

Andersson L.A., Dawson L.A. EXAFS spectroscopy of heme-containing oxygenases and peroxidases // Structure and Bonding. — 1991. — Vol. 64. — P. 1–40.

Angelini R., Federico R. Histochemical evidence of polyamino oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall // J. Plant Physiol. — 1989. — Vol. 135. — N 2. — P. 212–218.

Antonini E., Brunori M. Haemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. — North — Holland, Amsterdam, 1971. 242 p.

Apostol J., Heinsteins P.F., Low P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells // J. Plant Physiol. — 1989. — Vol. 90. — N 1. — P. 109–114.

Araiso T., Dunford H.B. Horseradish peroxidase. XXXVI. On the difference between peroxidase and metmyoglobin // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 89. — N 2. — P. 520–524.

Araiso T., Dunford H.B. Horseradish peroxidase. XLI. Complex formation with nitrate and its effect upon compound I formation // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1980. — Vol. 90. — N 4. — P. 1177–1182.

Araiso T., Dunford H.B. Effect of modification of heme propionate groups on the reactivity of horseradish peroxidase // Arch. Biochem. Biophys. — 1981. — Vol. 211. — N 1. — P. 346–351.

Araiso T., Dunford H.B., Chang C.K. Horseradish peroxidase. XXXVII. Compound I formation from reconstituted enzyme latching free carboxyl groups as heme side chains // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1979. — Vol. 90. — N 2. — P. 520–524.

Armstrong W.H. Metalloprotein crystallography: Survey of recent results and relationships to model studies. In Que, L., Jr., Ed. ACS Symposium Series 372: Metal Clusters in Proteins. American Chemical Society, Washington, 1988. — P. 1–27.

Austin J.C., Rodgers K.R., Spiro T.G. Protein structure from ultraviolet resonance Raman spectroscopy // *Methods Enzymol.* — 1993. — Vol. 226. — P. 374–396.

Ballare C.L., Barnes P.W., Kendrick R.E. Photomorphogenic effects of UV-B radiation on hypocotyl elongation in wild type and stable-phytochrome-deficient mutant seedlings of cucumber // *Physiol. Plant.* — 1991. — Vol. 83. — N 2. — P. 653–658.

Bateman L., Gee G. A kinetic investigation of the photochemical oxidation of certain non-conjugation olefins. // *Proc. Roy. Soc. Acad.* — 1948. — Vol. 195. — N 1042. — P. 376–391.

Bearden A.J., Dunham W.R. Iron electronic configuration in proteins: Studies by Mossbauer spectroscopy // *Structure and Bonding.* — 1970. — Vol. 8. — P. 1–52.

Birecka H., Galston A.W. Peroxidase ontogeny in a dwarf pea stem as affected by gibberellin and decapitation // *J. Exp. Bot.* — 1970. — Vol. 21. — N 4. — P. 735–739.

Blake A.D., Mumford R.A., Strout H.V., Slater E.E., Strader C.D. Synthetic segments of the mammalian ar are preferentially recognised by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1987. — Vol. 147. — N 1. — P. 168–173.

Blumberg W.E., Peisach J. The electronic structure of protoheme proteins. An electron paramagnetic resonance and optical study of cytochrome c peroxidase and its derivatives // *J. Biol. Chem.* — 1968. — Vol. 243. — N 8. — P. 1863–1870.

Blumberg W.E., Peisach J., Wittenberg B.A., Wittenberg J. The electronic structure of protoheme proteins. An electron paramagnetic resonance and optical study of horseradish peroxidase and its derivatives // *J. Biol. Chem.* — 1968. — Vol. 243. — N 8. — P. 1854–1862.

Bonagura C.A., Sundaramoorthy M., Pappa H.S., Patterson W.R., Poulos T.I. An engineered cation site in cytochrome c peroxidase alters the reactivity of the redox active tryptophan // *Biochemistry.* — 1996. — Vol. 35. — N 19. — P. 6107–6115.

Brittain T., Greenwood C., Springall J.P., Thomson A.J. Magnetic-circular-dichroism studies of haem a and its derivatives // *Biochem. J.* — 1978. — Vol. 173. — P. 411–417.

Browett W.R., Stillman M.J. Evidence for heme Π -cation radical species in compound I of horseradish peroxidase and catalase // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 660. — N 1. — P. 1–7.

Brown K., Fridovich I. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1981. — V. 206. — P. 414–419.

Buettner G.R., Moseley P.L. Ascorbate both activates and inactivates bleomycin by free radical generation // *Biochemistry.* — 1992. — Vol. 31. — N 40. — P. 9784–9788.

Cao H., Bowling S.A., Gordon A.S., Dong X. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance // *Plant Cell.* — 1994. — V. 6. — N 12. — P. 1583–1585.

Carmak I., Marschner H. Increase in membrane permeability and exudation in roots of zinc deficient plants // *Plant Physiol.* — 1988. — V. 132. — N 3. — P. 356–361.

Carraway K. L., Koshland D.E. Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents // *Biochim. et biophys. acta.* — 1968. — Vol. 160. — N 2. — P. 272–274.

Carraway K.L., Koshland D.E. Reaction of tyrosine reduces in proteins with carbodiimide reagents. In: *Methods in Enzymology*. N.Y. — London: Acad. Press. — 1972. — Vol. 25. — part B, P. 616–623.

Carraway K.L., Triplett R.B. Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups // *Biochem. et biophys. acta.* — 1970. — Vol. 200. — N 3. — P. 564–566.

Chance B. The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase // *J. Biol. Chem.* — 1943. — Vol. 151. — N 2. — P. 553–577.

Chance B. The primary and secondary compounds of catalase and methyl of ethyl hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* — 1949a. — Vol. 179. — N 3. — P. 1331–1339.

Chance B. The properties of the enzyme-substrate compound of horseradish peroxidase and peroxide. III. The reaction of complex II with ascorbic acid // *Arch. Biochem.* — 1949b. — Vol. 24. — P. 389–399.

Chance B. The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1952. — Vol. 41. — N 2. — P. 416–424.

Claiborow A., Fridovich I. Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of o-dianisidine by horseradish peroxidase. 2. Evidences for a substrate radical-enzyme complex and its reaction with nucleophiles // *Biochem. J.* — 1979. — Vol. 18. — N 11. — P. 2329–2335.

Clementi F., Palade C.E. Intestinal capillaries. I. Permeability to peroxidase and ferritin // *J. Cell Biol.* — 1969. — Vol. 41. — N 1. — P. 33–58.

Coldacre P.L., Galston A.W., Weintraub R.L. The effect of substituted phenols on the activity of the indoleacetic acid oxidase of peas // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1953. — Vol. 43. — N 2. — P. 358–343.

Cottle W., Kolattukudy E.P. Absciscic acid stimulation of suberinization: introduction of enzymes and deposition of polymeric components and associated waxes in tissue cultures of potato tuber // *Plant Physiol.* — 1982. — Vol. 70. — N 3. — P. 775–780.

Conroy C.W., Tyma P., Daum P.H., Erman J.E. Oxydation-reduction potential measurements of cytochrome c peroxidase and pH dependent spectral transitions in the ferrous enzyme // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1978. — Vol. 537. — N 1. — P. 62–69.

Critchlow J.E., Dunford H.B. Studies on horseradish peroxidase. IX. Kinetics of the oxidation of p-cresol by compound II // *J. Biol. Chem.* — 1972. — Vol. 248. — N 12. — P. 3703–3713.

Cunningham M.L., Johnson J.S. Photosensitized production of superoxide anion by monochromatic (290–405) ultraviolet irradiation of NADH and NADPH coenzymes // *Photochem. a. Photobiol.* — 1985. — Vol. 42. — P. 125–128.

Cupane A., Leone M., Vitrano E., Cordone L. Low temperature optical absorption spectroscopy: An approach to the study of stereodynamic properties of heme proteins // *Eur. Biophys. J.* — 1995. Vol. 23. — P. 385–398.

Czaniński Y., Catesson A.-M. Localisation ultrastructurale d'activité peroxidasiqnes dans les tissus conducteurs vegetaux an cour du cycle annuel // *J. Micr.* — 1969. — Vol. 8. — N 4. — P. 875–881.

Davies M.D., Jones P., Mantle D. The kinetics of formation of horseradish peroxidase compound I by reaction with peroxobenzoic acids. pH and peroxo acid substituent effects // *Biochem. J.* — 1976. — Vol. 157. — N 1. — P. 247–253.

Delincüe H., Radola B. Thin-layer Isoelectric Focusing on Sephadex Layers of Horseradish Peroxidase // *Biochim Biophys Acta.* — 1970. — Vol. 200. — P. 404–407.

Degli E.M. Prediction and comparison of the haem-binding sites in membrane haemoproteins // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1989. — Vol. 977. — P. 249–265.

Dickerson R.E., Takano T., Eisenberg D., Kallai O.B., Samson L., Cooper A., Margolish E. Ferricytochrome c. General features of the horse and bonito proteins at 2,8 Å resolution // *J. Biol. Chem.* — 1971. — Vol. 246. — N 5. — P. 1511–1535.

DiNello R.K., Dolphin D.H. Substituted hemins as probes for structure-function relationships in horseradish peroxidase // *J. Biol. Chem.* — 1981 — Vol. 56. — N 13. — P. 6903–6912.

Doke N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to hyphen wall components // *Physiol. Plant Pathol.* — 1983. — Vol. 23. — N 3. — P. 345–352.

Doke N. NADPH-dependent O_2^- generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans* // *Physiol. Plant Pathol.* — 1985. — Vol. 27. — N 3. — P. 311–317.

Doke N., Ohashi Y. Involvement of an O_2^- generating systems in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus // *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* — 1988. — Vol. 32. — N 1. — P. 163–169.

Dousov P., Leterrier F. Electron spin resonance of intermediates in the catalytic reaction of peroxidase at low temperature // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1970. — Vol. 220. — N 2. — P. 338–340.

Dure L., Cormier M.J. The oxidasation of phenol and its reaction product by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1963. — Vol. 11. — P. 489–495.

Dure L., Cormier M.J. Additional properties of the peroxidase // *J. Biol. Chem.* — 1964. — Vol. 239. — P. 2351–2359.

Dunford H.B., Hewison W.D. Effect of mixed solvents of the formation of horseradish peroxidase compound I. The importance of diffusion-controlled reactions // *Biochemistry.* — 1977. — Vol. 16. — N 13. — P. 2949–2957.

Dunford H.B., Hewison W.D., Steiner H. Horseradish peroxidase. XXIX. Reactions in water and deuterium oxide; cyanide binding, compound I formation, and reactions of compound I and II with ferrocyanide // *Can. J. Chem.* — 1978. — Vol. 56. — N 22. — P. 2844–2852.

Dunford H.B., Stillman J.S. On the function and mechanism of action of peroxidase // *Coord. Chem. Rev.* — 1976. — Vol. 19. — N 3. — P. 187–251.

Effects of low temperatures on biological membranes / Eds. Morris G.J., Clarke A. London etc.: Acad. press, 1981. 432 p.

Ellis R.H., Osei-Bonsu K., Roberts E.H. The influence of Genotype, Temperature and Moisture on Seed Longevity in Chickpea, Cowpea and Soya Bean // *Ann. Bot.* — 1982. — Vol. 50. — N 1. — P. 69–82.

Elstotner E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity // *Ann. Rev. Plant Physiol.* — 1982. — V. 33. — N 1. — P. 73–96.

El-Zahaby H., Kiraly Z., Adam A., Barna B., Klement Z. Inhibition of disease symptoms and pathogens in plants by oxy free radicals // 1st International conference «Oxygen and environmental stresses in plants». Univ. of St. Andrews, Sept. 6–10, 1993. — C. 70.

Espellie K.E., Francheschi V.R., Kollattukudy P.E. Immunocytochemical localisation and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue // *Plant Physiol.* — 1986. — Vol. 81. — N 2. — P. 487–492.

- Falk J.E.* Porphyrins and Metalloporphyrins // Amsterdam. — N.Y. — London etc.: Elsevier, 1964. 236 p.
- Falk J.E.* Bond structure in haem compounds // *Enzymologia*. — 1967. — Vol. 32. — P. 3–12.
- Ferrer M.A., Menoz R., Ros Barcelo A.* A biochemical and cytochemical study of the cuticle-associated peroxidases in Lupines // *Ann. Bot.* — 1991. — Vol. 67. — N 3. — P. 561–568.
- Finzel B.C., Poulos T.L., Kraut J.* Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-E resolution // *J. Biol. Chem.* — 1984. — Vol. 259. — N 21. — P. 13027–13036.
- Fita I., Silva A.M., Murthy M.R.N., Rossmann M.G.* The refined structure of beef liver catalase at 2.5 E resolution // *Acta Crystallogr.* — 1986. — N 42. — P. 497–515.
- Foyer Ch., Rowell J., Walker D.* Measurement of the Ascorbate Content of Spinach Leaf Protoplasts and Chloroplasts during Illumination // *Planta*. — 1983. — Vol. 157. — N 3. — P. 239–245.
- Fridovich I.* Biological effects of the superoxide radical // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1986. — V. 247. — N 1. — P. 1–11.
- Fried R., Fried L.W., Babin D.R.* Biological role of xantine oxidase and tetrazoliumreductase inhibitor // *Eur. J. Biochem.* — 1973. — Vol. 33. — N 3. — P. 439–445.
- Fry S.C.* Formation of isodityrosine by peroxidase isozymes // *J. Exp. Bot.* — 1987. — Vol. 38. — N 3. — P. 853–859.
- Gajhede, M., Henriksen, A., Schuller, D.J., Poulos, T.I., Smith, A.T.* Crystal structure of Horseradish peroxidase C (HRPC): with and without the substrate benzohydroxamic acid (BHA) bound in the active site, in *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology, 1996* (IV International symposium, July 6–10, 1996, Vienna, Austria) p. O2.
- Gaspar T., Penel C., Castillio I., Greppin H.* A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development // *Physiol. Plant.* — 1985. — Vol. 64. — N 4. — P. 895–934.
- Gazarian I.G., Lagrimini L.M.* Anaerobic stopped-flow studies of indole-3-acetic acid oxidation by dioxygen catalysed by horseradish C and anionic tobacco peroxidase at neutral pH: catalase effect // *Biophys. Chem.* — 1998. — Vol. 72: — N 1. — P. 231–237.
- Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A., Thorneley R.F.* Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: Anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases // *Biochem. J.* — 1996. — Vol. 313. — P. 841–847.
- Gazarian I.G., Lagrimini L.M., Mellon F.A., Naldrett M.J., Ashby G.A., et al.* Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. 333. — P. 223–232.
- Gazarian I.G., Chubar T.A., Mareeva E.A., Lagrimini L.M., Van Huystee R.B., Thorneley R.N.F.* Aerobic oxidation of indol-3-acetic acid catalysed by anionic and cationic peanut peroxidase // *Phytochemistry*. — 1999. — Vol. 51. — P. 175–186.
- Gerald D.S., Efron M.L.* Chemical studies of several varieties of H.B.M // *Proc. Natn. Acad. U.S.* — 1961. — Vol. 47. — N 11. — P. 1758–1767.
- Gibson D.M., Lin E.H.* The inhibition of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activity by British antilewisite // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1978. — Vol. 186. — N 3. — P. 317–324.

- Gouet P., Jouve H.-M., Dideberg O. Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH // J. Mol. Biol. — 1995. — Vol. 249. — P. 933–954.
- Gregoriou V.G., Jayaraman V., Hu X., Spiro T.G. FT-IR difference spectroscopy of haemoglobins A and kempsey: Evidence that a key quaternary interaction induces protonation of Asp b99 // Biochemistry. — 1995. — Vol. 34. — N 20. — C. 6876–6882.
- Graham M.Y., Graham T.Z. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan // Plant Physiol. — 1991. — Vol. 97. — P. 1445–1455.
- Graham D., Patterson B. Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins metabolism and acclimation // Ann. Rev. Plant Physiol. — 1982. — V. 33. — N 2. — P. 347–372.
- Grierson D., Covey S. Plant molecular biology. New York, 1984. 176 p.
- Gripshover B., Morre D.J., Boss W.F. Fractionation of suspension cultures of wild carrot and kinetics of membrane labeling // Protoplasma. — 1984. — Vol. 123. — N 1. — P. 213–217.
- Grob K., Matile Ph. Compartmentation of Ascorbic Acid in Vacuoles of Horseradish Root Cells. Note on Vacuolar Peroxidase // Z. Pflanzenphysiol. — 1980. — Bd. 98. — N 2. — S. 235–239.
- Halliwel B. Lignin synthesis. The generation of hydrogen peroxide by horse-radish peroxidase and its stimulation by manganese and phenols // Planta. — 1978. — V. 140. — N 1. — P. 81–88.
- Halliwel B. The toxic effects of oxygen on plant tissues / Superoxide dismutase L.I. Ed. L. W. Olrley Ed. CRC Press. Boca Raton. Fl. — 1982. — P. 89–123.
- Hammer B., Parker W., Bennett J. NMDA receptors increase OH radicals in vivo by using nitric oxide synthase and protein kinase C // Neuro Report. — 1993. — Vol. 5. — N 1. — P. 72–74.
- Hannemann J., Duwe J., Baumann K. Iron — and ascorbic acid-induced lipid peroxidation in renal microsomes isolated from rats treated with platinum compounds // Cancer. Chemother. Pharmacol. — 1991. — Vol. 28. — N 6. — P. 427–433.
- Hanson L.K., Chang C.K., Davis M.S., Fajer J. Electron pathways in catalase and peroxidase enzymic catalysis. Metal and macrocycle oxidations of iron porphyrins and chlorins // J. Amer. Chem. Soc. — 1981. — Vol. 103. — N 3. — P. 663–670.
- Haschke R.H., Friedhoff J.M. Calcium-related properties of horseradish peroxidase // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1978. — Vol. 80. — N 4. — P. 1039–1042.
- Hasinoff F., Dunford H.B. Kinetics of the oxidation of ferrocyanide by horseradish peroxidase compounds I and II // Biochemistry. — 1970. — Vol. 9. — N 25. — P. 4930–4939.
- Hayashi N., Mutokawa Y., Kikuchi G. Studies on relationships between structure and function of haemoglobin M water // J. Biol. Chem. — 1966. — Vol. 241. — N 1. — P. 84–89.
- Henry Y., Lepoivre M., Drapier J.-C., Ducrocq C., Boucher J.-L., Guissani A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles // FASEB J. — 1993. — Vol. 7. — P. 1124–1134.
- Hewson W.D., Dunford H.B. Oxidation of p-cresol by horseradish peroxidase compound I // J. Biol. Chem. — 1976a. — Vol. 251. — N 19. — P. 6036–6042.
- Hewson W.D., Dunford H.B. Stoichiometry of the reaction between horseradish peroxidase // J. Biol. Chem. — 1976b. — Vol. 251. — N 19. — P. 6043–6052.
- Hoare D.G., Koshland D.E. A procedure for the selective modification of carboxylic acid groups in proteins // J. Amer. Chem. Soc. — 1966. — Vol. 88. — N 9. — P. 2057–2059.

Hoare D.G., Koshland D.E. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic groups in proteins // *J. Biol. Chem.* — 1967. — Vol. 242. — N 11. — P. 1447–2453.

Hoffman B.M., Roberts J.E., Kang C.H., Margolish E. Electron paramagnetic and electron nuclear double resonance of the hydrogen peroxide compound of cytochrome c peroxidase // *J. Biol. Chem.* — 1981. — Vol. 256. — N 13. — P. 6556–6564.

Holzbaun I.E., English A.M., Ismail A.A. Infrared spectra of carbonyl horseradish peroxidase and its substrate complexes: Characterisation of pH-dependent conformers // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1996. — Vol. 118. — N 14. — C. 3354–3359.

Howarth C. The heat — shock proteins in *Sorghum bicolor* and *pennisetum americanum*. II. Stored RNA in *Sorghum* Seeds and its relationship to Heat Shock Protein Synthesis During Germination // *Plant Cell Environm.* — 1990. — Vol. 13. — N 1. — P. 57–64.

Hubbard C.D., Dunford H.B., Hewson W.D. Horseradish peroxidase. XVII. Reactions of compound I and II with p-aminobenzoic acid in deuterium oxide // *Can. J. Chem.* — 1975. — Vol. 53. — N 6. — P. 1563–1569.

Hughes R.C. Glycoproteins. Chapman and Hall, London, 1983.

Ishida A., Ookubo K., Ono K. Formation of hydrogen peroxide by NAD(P)H oxidation with isolated cell wall-associated peroxidase from cultured liver wrote cells, *Marchantia polymorpha* L // *Plant All Physiol.* — 1987. — Vol. 28. — N 4. — P. 723–728.

Ishimaru A. On the structure-function relationship and peroxygenase // *Bioorg. Chem.* — 1980. — Vol. 9. — N 4. — P. 472–481.

Itagaki E., Palmer G., Hager L.P. Effect of mixed solvents of the formation of horseradish peroxidase compound I // *J. Biol. Chem.* — 1967. — Vol. 242. — P. 2272–2277.

Jamada H., Jamasaki J. Effect of modification of function groups on the reactivity of horseradish peroxidase // *Arch. Biochem. and Biophys.* — 1974. — Vol. 165. — P. 728–738.

Jamada H., Makino R., Jamasaki J. Effect of 2,4-substituents of deuteroheme upon redox potentials of horseradish peroxidases // *Arch. Biochem. and Biophys.* — 1975. — Vol. 169. — P. 344–353.

Jayaraman V., Mukerji I., Rodgers K.R., Spiro T.G. pH dependence of haemoglobin conformational dynamics probed by UV resonance Raman spectroscopy // *Biophys.J.* — 1994. — Vol. 66. — N 2. — Pt. 2 — C. 11.

Jensem W.A., Kavaljian L.G. The Cytochemical Localization of Ascorbic Acid in Root Tip Cells // *J. Biophys. Biochem. Cytology.* — 1956. — Vol. 2. — N 1. — P. 87–92.

Job D., Dunford H.B. Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I. — *Eur. J. Biochem.* — 1976. — Vol. 66. — N 3. — P. 607–614.

Job D., Jones P. Compound I formation with turnip peroxidases and peroxibenzoic acids // *Eur. J. Biochem.* — 1978. — Vol. 86. — N 2. — P. 565–572.

Johansson M.W. Peroxinection, a cell-adhesive peroxidase // *Plant Peroxidase Newsletter* 1997. — N 9. — P. 3–5.

Jones P., Dunford H.B. On the mechanism of compound I formation from peroxidases and catalases // *J. Theor. Biol.* — 1977. — Vol. 69. — N 2. — P. 457–470.

Jones P., Dunford H.B. Horseradish peroxidase. XXVIII. Formation and reactivity of the alkaline form. Evidence an enzyme — substrate complex in compound I formation // *Can. J. Biochem.* — 1978. — Vol. 56. — N 10. — P. 702–707.

Jouselle M. Chemical studies on yeast hexokinase specific modification of a single tyrosyl residue with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide // *Eur. J. Biochem.* — 1977. — Vol. 74. — N 3. — P. 478–480.

Kaneko Y., Tamura M., Yamazaki I. Formation of porphyrin action radical in Zinc-substituted horseradish peroxidase // *Biochemistry.* — 1980. — Vol. 19. — N 12. — P. 5795–5799.

Kantor G.J., Ritter C. Sunlight-induced killing of nowtiding human cell in culture // *Photochem. a. Photobiol.* — 1983. — Vol. 37. — P. 533–538.

Kay E., Shannon L., Lew J.Y. Peroxidase isozymes from horseradish root. II. Catalytic properties // *J. Biol. Chem.* — 1967. — Vol. 242. — N 10. — P. 2470–2473.

Keilin B.D., Hartree E.F. Purification of horseradish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin // *Biochem. J.* — 1951. — Vol. 49. — N 1. — P. 88–104.

Keilin D., Hartree E.F. Catalase, peroxidase and metmyoglobin as catalysts of coupled peroxidatic reactions // *Biochem. J.* — 1955. Vol. 60. — N 2. — P. 310–325.

Kendrew I.C. Myoglobin and the structure of proteins // *Science.* — 1963. — Vol. 139. — N 3561. — P. 1259–1266.

Kimura S., Yamazaki I., Kitagawa T. Unusual low-frequency resonance Raman spectra of heme observed for hog intestinal peroxidase and its derivatives // *Biochemistry.* — 1981. Vol. 20. — N 16. — P. 4632–4638.

Kitagawa T., Ozaki Y. Infrared and Raman spectra of metalloporphyrins // *Structure and Bonding.* — 1987. — Vol. 64. — P. 71–114.

Klapper M.H., Hackett D.P. The oxidatic activity of horseradish peroxidase. I. Oxidation of hydro and naphthohydroquinones // *J. Biol. Chem.* — 1963. — Vol. 238. — N 11. — P. 3736–3742.

Klapper M.H., Hackett D.P. Investigations on the multiple components of commercial horseradish peroxidase // *Biochem. et biophys. acta.* — 1965. — Vol. 96. — N 2. — P. 271–282.

Kobayashi A., Kaneko M., Watanabe Y. The relation between free radical and glutathion peroxidase in cardiomyopathic hamster bio.14.6 // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* — 1987. — V. 19. — N 1. — P. 35–41.

Konev S.V., Volotovskiy J., Sheiko L. UV-inactivation of enzyme in supramolecular complexes of biological membranes. The phenomenon of photochemical allotropy // *Photochem.a.Photobiol.* — 1978. — V. 27. — N 2. — P. 287–296.

Kosuge T. The role of phenolics in host response to infection // *Ann. Rev. Phytopathol.* — 1969. — Vol. 7. — N 1. — P. 195–201.

Kunert K.J., Ederer M. Leaf aging and lipid peroxidation: the role of the antioxidants vitamin C and E // *Physiol. plant.* — 1985. — Vol. 65. — N 1. — P. 85–88.

Kunishima N., Fukuyama K., Matsubara H., Hatanaka H., Shibano Y., Amachi T. Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases // *J. Mol. Biol.* — 1994. — Vol. 235. — P. 331–344.

La Mar G.N., Ropp J.S., Smith K.M., Langry K.C. Proton nuclear magnetic resonance investigation of the electronic structure of compound I of horseradish peroxidase // *J. Biol. Chem.* — 1981. — Vol. 10. — N 1. — P. 237–243.

Lañir A., Schejter A. Nuclear magnetic resonance evidence for the absence of iron coordinated water in horseradish peroxidase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1975. — Vol. 62. — N 2. — P. 199–203.

Lascu I., Abrudan I., Muresan L., Presecan E., Vonica A., Prionov T. Salting-out chromatography on unsubstituted sepharose CL-6B as a convergent method for purifying proteins from dilute crude extracts. Application to horseradish peroxidase // J. Chromatogr. — 1986. — Vol. 357. — N 2. — P. 436–439.

Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Principles of biochemistry, 2nd ed. Worth Publishers, New York, 1993.

Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. V.1. N.Y. etc.: Acad. press, 1980. 497 p.

Likhatchev B.S., Zelensky G.V., Kiashko Yu.G., Shevchenko Z.N. Modelling of Seed Aging // Seed Sci. Technol. — 1984. — Vol. 12. — P. 385–393.

Loew G.H., Kert C.J., Hjelmeland L.M., Kirchner R.P. Active site models of horseradish peroxidase compound I and a cytochrome P-450 anagobic. Electronic structure and field gradients // J. Amer. Chem. Soc. — 1977. — Vol. 99. — N 10. — P. 3534–3536.

Ma X., Rokita S. Role of Oxygen during Horseradish Peroxidase Turnover and Inactivation // Biochem Biophys Res Commun. — 1988. — Vol. 157. — P. 160–165.

MacAdam J.N. Peroxidase activity and termination of cell elongation in tall fescue leaf blades // J. Cell. Biochem. — 1993. — Suppl. 17A. — P. 29.

McCapra G., Behesti I. Bioluminescence and chemiluminescence: Instruments and applications / Ed. Van Dyke K. Boca Raton: CRC Press, 1985. Vol. 1. P. 9–42.

Möder M., Amberg-Fischer V. Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. I. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidases // Plant Physiol. — 1982. — Vol. 70. — N 4. — P. 1128–1131.

Maeda Y., Marita Y. Moessbauer effect in peroxidase-hydrogen peroxide compounds // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1967. — Vol. 29. — N 5. — P. 680–685.

Maehly A.C. Splitting of horseradish peroxidase into prosthetic group and protein as a means of studying the linkages between hemin and protein // Biochem. Biophys. Acta. — 1952. — Vol. 8. — N 1. — P. 1–8.

Mapson L.W.L. Ascorbinsaure biochemical systems. In: The Vitamins. Chemistry, physiology, methods. Ed. W.H. Sebrell, Jr. R.S. Harris. New York–London, 1967, P. 386.

McGinnity D.F., Devreese B., Prazeres S., Van Beeumen J., Moura I., Moura J.J.G. Pettigrew G.W. A single histidine is required for activity of cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans* // J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271. — N 19. — C. 11126–11133.

Melon J.E. Purification and characterisation of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures // Plant Physiol. — 1991. — Vol. 95. — N 1. — P. 14–20.

Metodiewa D., Pieres de Melo M., Escobar J.A., Cilento G., Dunford H.B. Horseradish peroxidase-catalysed aerobic oxidation and peroxidation of indole-3-acetic acid. I. Optical spectra // Arch. Biochem. Biophys. — 1992. — Vol. 296. — N 1. — P. 27–33.

Metraux J.P., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber // Science. — 1990. — V. 250. — N 4983. — P. 106–112.

Mincey T., Traylor T.Q. Anion complexes of ferrous porphyrins // J. Amer. Chem. Soc. — 1979. — Vol. 101. — N 3. — P. 765–766.

Müller K.M., Ottolenghi P. The oxidation of o-dianisidine by H₂O₂ and peroxidase at neutral pH // Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. — 1966. — Vol. 35. — N 16. — P. 369–389.

Morishima J., Ogawa S. Proton nuclear magnetic resonance studies of compounds I and II of horseradish peroxidase // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1978. — Vol. 83. — N 3. — P. 946–953.

Moss T.H., Ehrenbery A., Bearden A.J. Moessbauer spectroscopic evidence for the electronic configuration of iron in horseradish peroxidase and its peroxide derivatives // *Biochemistry*. — 1969. — Vol. 8. — N 10. — P. 4159–4162.

Muirhead H., Cox J.M., Mazzarella L., Perutz M.F. Structure and function haemoglobin. A three-dimensional fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5,5 E resolution // *J. Mol. Biol.* — 1967. — Vol. 28. — N 1. — P. 117–156.

Murthy M.R.N., Reid T.J., Sicignano A., Tanaka N., Rossmann M.G. Structure of beef liver catalase // *J. Mol. Biol.* — 1981. — Vol. 152. — N 2. — P. 465–499.

Murshudov G.N., Melik-Adamyany W.R., Grebenko A.I., Barynin V.V., Vagin A.A., Vainshtein B.K., Dauter Z., Wilson K.S. Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 E resolution // *FEBS Lett.* — 1992. — Vol. 312. — P. 127–131.

Neuman P.R., Fong F., Newton R.J., Sen S. Induction of peroxidase enhancement by ABA in cotyledon explants of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) // *J. Plant Physiol.* — 1992. — V. 139. — N 2. — P. 343–349.

Ogawa S., Shira Y., Morishima I. Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1979. — Vol. 90. — N 2. — P. 674–678.

Paciolla C., Stefan A., Di Gara L. Ascorbate system in *Dasypyrum villosum* from different environments // *Bell. Soc. ital. biol. sper.* — 1991. — Vol. 67. — N 7. — P. 699–706.

Padlan E., Love W.E. Probes of enzymes and hemoproteins. — Academic Press, New York, 1971. 187 p.

Pang A., Catesson A.-M., Francesch C., Rolando C., Goldberg R. On substrate specificity of peroxidases involved in the lignification process // *J. Plant Physiol.* — 1989. — Vol. 135. — N 2. — P. 325–331.

Pappa H.S., Tajbaksh S., Saunders A.J., Pielak G.J., Poulos T.I. Probing the cytochrome c peroxidase-cytochrome c electron transfer reaction using site specific cross-linking // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35. — N 15. — C. 4837–4845.

Park R.D., Park C.K. Oxidation of indole-3-acetic acid-amino acid conjugates by horseradish peroxidase // *Plant Physiol.* — 1987. — Vol. 84. — N 3. — P. 826–829.

Paul K.G., Boyer P.D., Lardy H., Myrback K. The enzymes. — Academic press, New York, 1963, v. 8, ed 2, 227 p.

Paul K.G., Ohlsson P.I. Equilibria between horseradish peroxidase and aromatic donors // *Acta Chem. Scand.* — 1978. — B 32. — N 6. — P. 395–405.

Peak M.J., Peak J.G., Webb R.B. Inactivation of transforming DNA by ultraviolet light. II. Protection by histidine against near UV irradiation // *Mut. Res.* — 1973. — Vol. 20. — N 1. — P. 143–147.

Perutz M.F., Lehmann H. Effect of a single amino acid substitution on stability of conformation of hemoglobin // *Nature*. — 1968. — Vol. 219. — N 5149. — P. 902–909.

Perutz M.F., Muirhead H., Cox J.M., Goaman L.C.G. Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2-8 E resolution; The atomic model // *Nature*. — 1968. — Vol. 219. — N 5150. — P. 131–139.

Pettigrew G.W., Aviram I., Schejter A. The role of the lysines in the alkaline heme-linked ionization of ferric cytochrome c // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1976. — Vol. 68. — N 3. — P. 807–817.

Phelps C., Forlani L., Antonini E. The hydrogen ion equilibria of horseradish peroxidase and apoperoxidase // *Biochem J.* — 1971. — Vol. 124. — N 3. — P. 605–614.

Pieres de Melo M., Escobar J.A., Metodiowa D., Dunford H.B., Cilento G. Horseradish peroxidase-catalysed aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. II. Oxygen uptake

and chemiexcitation // Arch. Biochem. and Biophys. — 1992. — Vol. 296. — N 1. — P. 34–39.

Pikul J., Kummerow F.D. Relative role of individual phospholipids on thiobarbituric acid reactive substances formation in chicken meat, skin, and swine aorta // J. Food Sci. — 1990. — V. 55. — N 5. — P. 1243–1248.

Poulos T.L., Edwards S.L., Wariishi H., Gold M.H. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 E // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — P. 4429–4440.

Poulus T.I., Freer S.T., Alden R.A., Edwards S.I., Skogland V., Takio K., Eriksson B., Xuong N., Yoneiani T., Kraut J. The crystal structure of cytochrome c peroxidase // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — N 2. — P. 575–580.

Poulos T.L., Sheriff S., Howard A.J. Cocystals of yeast cytochrome c peroxidase and horse heart cytochrome c // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 13881–13884

Prichard P., Cormier M. Studies on the Mechanism of the the Horseradish Peroxidase Catalyzed Luminescent Peroxidation of Luminol // Biochem Biophys Res Commun. — 1968. — Vol. 31. — P. 131–137.

Priestley D.A. Seed Ageing: Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil. Ithaca: Comstock Publ. Associates, 1986. P. 39–42.

Ralston I., Dunford H.B. Horseradish peroxidase. XXII. pH dependence of the oxidation of L-(-)-tyrosine by compound I // Can. J. Biochem. — 1978. — Vol. 56. — N 12. — P. 1115–1119.

Raskin I. Role of salicylic acid in plants // Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol. — 1992. — V. 43. — N 3. — P. 439–442.

Reid T.J., Murthy M.R.N., Sicignano A., Tanaka N., Donald W., Musick L., Possmann M.G. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution // Proc. Nat. Acad. Sci. USA Biol. Sci. — 1981. — Vol. 78. — N 8. — P. 4767–4771.

Ricard J., Job D. Reaction Mechanism of Indole-3-Acetate Degradation by Peroxidases. A Stopped-Flow and Low-Temperature Spectroscopic Study // Eur. J. Biochem. — 1974. — Vol. 44. — P. 359–371.

Riehm J.P., Sheraga H.A. Structural studies of ribonuclease. XXI. The reaction between ribonuclease and a water-soluble carbodiimide // Biochemistry. — 1966. — Vol. 5. — N 1. — P. 99–102.

Roberts D.A. Systemic acquired resistance induced in hypersensitive plants by nonnecrotic localised viral infections // Virology. — 1983. — Vol. 122. — N 1. — P. 207–209.

Roman R., Dunford H.B. Studies on horseradish peroxidase. XII. A kinetic study of the oxidation of sulfite and nitrite by compound I and II // Can. J. Chem. — 1973. — Vol. 51. — N 2. — P. 589–596.

Ronnberg M., Araisio T., Ellfolk N., Dunford H.B. The catalytic mechanism of Pseudomonas cytochrome c peroxidase // Arch. Biochem. Biophys. — 1981. — Vol. 207. — N 1. — P. 197–204.

Ros Barcelo A., Menoz R., Sababer F. Lupin peroxidases. I. Isolation and characterisation of cell wall-bound isoperoxidase activity // Physiol. Plantarum. — 1991. — Vol. 71. — N 4. — P. 448–456.

Roschupkin D.I., Pelenitsyn A.B. Study of the effect of ultraviolet light on biomembranes. IV. The effect of oxygen on UV-induced hemolysis and lipid photoperoxidation in rat erythrocytes and liposomes // Photochem. a. Photobiol. — 1975. — Vol. 21. — N 1. — P. 63–69.

Roschupkin D.I., Pistov M.Y., Potopenko A.Y. Inhibition of ultraviolet light induced erythema by antioxidants // Arch. Dermatol. Res. — 1979. — Vol. 266. — N 1. — P. 91–94.

- Sahulka J.* Electrophoretic study on peroxidase, indoleacetic acid oxidase, and o-diphenol oxidase fraction in extractis from differents growth zone of *Vicia faba* L. Roots // *Biol. Plant.* — 1970. — Vol. 12. — N 1. — P. 191–198.
- Saijo R., Takeo T.* Induction of peroxidase activity by ethylene and indole-3-acetic in tea shoots // *Agr. Biol. Chem.* — 1974. — Vol. 38. — N 11. — P. 2283–2284.
- San W.Q., Leopold A.C.* The Glassy State and Accelerated Aging of Soybeans // *Physiol. Plant.* — 1993. — V. 89. — P. 767–774.
- Santimone M.* Titration study of guaiacol oxidation of horseradish peroxidase // *Can. J. Biochem.* — 1975. — Vol. 53. — N 6. — P. 649–657.
- Saunders B., Holmes-Siedle A., Stark B.* Peroxidase: The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. London: Butterworths, 1964. 271 p.
- Savitsky, P.A., Gazaryan, I.G., Tishkov, V.I., Lagrimini, L.M., Ruzgas, T. & Gorton, L.* Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure // *Biochem. J.* — 1999. — Vol. 340. — P. 579–583.
- Schloss P., Walter C., Mader M.* Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L // *Planta.* — 1987. — Vol. 170. — N 1. — C. 225–231.
- Schonbaum G.R., Lo S.* Internaction of peroxidases with aromatic peroxides and alkyl peroxides // *J. Biol. Chem.* — 1972. — Vol. 247. — N 10. — P. 3353–3360.
- Schuller D.J., Ban N., van Huystee R.B., McPherson A., Poulos T.I.* Properties and structure of peroxidase / *Structure.* — 1996. — Vol. 4. — N 2. — P. 311–321.
- Scott D.* CO₂ exchange of plants. 3. Temperature acclimatisation of Three species. // *N.Z. J. Bot.* — 1970. — V. 8. — N 3. — P. 369–379.
- Searle C.* Chemical carcinogens as laboratory hazards. *Chemical carcinogens* / Ed. Ch. E. Searle. Washington, 1984. P. 303–324.
- Shannon L.M., Kay E., Lew Y.Y.* Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties // *J. Biol. Chem.* — 1966. — Vol. 241. — N 9. — P. 2166–2172.
- Sharon N.* Lis-H-lectins-cell-agglutinating and sugar-specific proteins // *Sci. Amer.* — 1974. — Vol. 230. — N 5. — P. 78–86.
- Shih J.H.C., Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y.* Peroxidase isoenzymes from horseradish roots // *J. Biol. Chem.* — 1971. — Vol. 246. — N 14. — P. 4546–4551.
- Siegel B.Z., Galston A.W.* Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase // *Science.* — 1967. — Vol. 157. — N 3794. — P. 1557–1559.
- Singal P.K., Tong J.* Vitamin E deficiency accentuates adriamicininduced cardiomyopathy and cell surface changes // *Mol. and Cell. Biochem.* — 1988. — Vol. 84. — N 2. — P. 163–171.
- Slocum R.D., Furey M.J.* Electron-microscopic cytochemical localisation of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues // *Planta.* — 1991. — Vol. 183. — N 3. — P. 443–448.
- Smith D.W., Williams R.J.P.* Binding of ascorbic acid to horseradish peroxidase catalysis // *Structure and Binding.* — 1970. — Vol. 7. N 1. — P. 1–45.
- Sonne C.* The biological effect of the ultraviolet rayes and investigations as to what part of the spectrum they lie // *Arch. Phys. Therapy, x-ray, Radium.* — 1929. — Vol. 10. — P. 239–252.
- Southerton S.G., Deverall B.J.* Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus // *Plant Pathol.* — 1990. — Vol. 39. — N 2. — P. 223–229.
- Srivastava O.P., Huystee R.B.* IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isozymes // *Phytochemistry.* — 1977. — Vol. 16. — N 10. — P. 1527–1530.

Stephan D., van Huystee R.B. Some aspects of peroxidase synthesis by cultured peanut // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1981. — B. 101. — N 2. — S. 313–319.

Stillman M.J., Kollebone B.R., Stillman J.S. Characterisation of the chromophores in horseradish peroxidase compounds I and II using magnetic circular dichroism // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1976. — Vol. 72. — N 2. — P. 554–559.

Strickland E.H. Circular dichroism of horseradish peroxidase and its enzyme-substrate compounds // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1968. — Vol. 151. — N 1. — P. 70–75.

Sugita Y., Yoneyama Y. Oxygen equilibrium of haemoglobins containing unnatural hemes. Effect of modification of heme carboxyl groups and side chains at positions 2 and 4 // *J. Biol. Chem.* — 1971. Vol. 246. — N 2. — P. 389–401.

Sundaramoorthy M., Kishi K., Gold M.H., Poulos T.L. The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution // *J. Biol. Chem.* — 1994. Vol. 269. — P. 32759–32767.

Swedin B., Theorell H. Dioximalic acid oxidase action of peroxidase // *Nature.* — 1940. — Vol. 145. — N 3663. — P. 71–72.

Takio K., Titani K., Ericsson L.H., Yonetani T. Primary structure of yeast cytochrome c peroxidase. II. The complete amino acid sequence // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, Vol. 203. — N 2. — P. 615–629.

Taylor A.O., Rowley J.A. Plant under climatic stress. Low temperature high light effects on photosynthesis. // *Plant Physiol.* — 1971. — V. 47. — P. 713–718.

Temperature and life / Ed. by Precht H. Berlin etc.: Springer, 1973. 779 p.

Teraoka J., Katagawa T. Structural implication of the heme linked ionisation of HRP-probed by the Fe-histidine stretching Roman line // *J. Biol. Chem.* — 1981. — Vol. 256. — N 8. — P. 3696–3977.

Thompson J.E., Legge R.L., Barber R.F. The role of free radicals in senescence and wounding // *New Phytol.* — 1987. — Vol. 105. — N 3. — P. 317–344.

Timkovich R. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins // *Anal. Biochem.* — 1977. — Vol. 79. — N 1. — P. 135–143.

Trost L.C., Wallace K.B. Stimulation of myoglobin-dependent lipid peroxidation by adriamycin // *Biophys. Res. Commun.* — 1994. — Vol. 204. — N 1. — C. 23–29.

Tuan-Hua David Ho., Martin M. Sachs. Stress-induced proteins: characterization and the regulation of their synthesis // *Biochem. Plants.* — 1980. — N 7. — P. 340–360.

Ugarova N.N., Kutuzova G.D., Rogoshin V.V., Berezin I.V. Functionally important carboxylic groups in horse radish peroxidase // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1984. — Vol. 790. — N 1. — P. 22–30.

Ugarova N.N., Lebedeva O.V., Berezin I.V. Horseradish peroxidase catalysis. I. Steady-state kinetics of peroxidase-catalyzed individual and co-oxidation of potassium ferrocyanide and o-dianisidine by hydrogen peroxide // *J. Mol. Catal.* — 1981. — Vol. 13. — N 1. — P. 215–225.

Vazquez-Ramos J.M., Lopez S., Vazquez E., Murillo E. DNA Integrity and DNA Polymerase Activity in Deteriorated Maize Embryo Axes // *J. Plant Physiol.* — 1988. — Vol. 135. — N 4. — P. 416–421.

Welinder K.G., Smillie L.B., Schonhaum G.R. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. I. Tryptic peptides // *Canad. J. Biochem.* — 1972. — Vol. 50. — N 1. — P. 44–62.

Welinder K.G. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini. Cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence,

and some structural characteristics of horseradish peroxidase C // Eur. J. Biochem. — 1979. — Vol. 96. — N 3. — P. 483–502.

Welinder, K. Plant Peroxidases. Their Primary, Secondary and Tertiary Structures and Relation to Cytochrome C Peroxidases // Eur. J. Biochem. — 1985. — Vol. 151. — P. 497–502.

Welinder K.G., Mazza C. Aminoacid sequence of heme-linked histidin-containing peptides of five peroxidases from horseradish and turnip // Eur. J. Biochem. — 1977. — Vol. 73. — N 2. — P. 353–358.

Wieringa-Brants D.H., Dekker W.C. Induced resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus by injection of intercellular fluid from tobacco plants with systemic acquired resistance // Phytopathology. — 1987. — Vol. 118. — N 2. — P. 165–170.

Wilcox S.K., Jensen G.M., Fitzgerald M.M., McRee D.E., Goodin D.B. Altering substrate specificity at the heme edge of cytochrome c peroxidase // Biochemistry. — 1996. — Vol. 35. — N 15. — C. 4858–4866.

Winterhalter K.H., Anderson N.M., Amiconi G., Antonini E., Brunori M. Functional properties of Haemoglobin Zurich // Eur. J. Biochem. — 1969. — Vol. 11. — N 3. — P. 435–440.

Yamade H., Makino R., Yamazaki I. Effect of 2,4-substituents of deteroheme upon redox potentials of horseradish peroxidase // Arch. Biochem. Biophys. — 1975. — Vol. 169. — N 1. — P. 344–353.

Yamada H., Yamazaki I. Heme-linked protonation of HCN, CO, NO and O₂ complexes of reduced horseradish peroxidases // Arch. Biochem. Biophys. — 1975. Vol. 171. — N 2. — P. 737–744.

Yamazaki J., Piette L.H. Mechanism of aerobic oxidase reaction catalysed by peroxidase // Biochem. Biophys. Acta. — 1963. — Vol. 77. — N 1. — P. 47–64.

Yonetani T., Ray G.S. Studies on cytochrome c peroxidase. III. Kinetics of the peroxidatic oxidation of ferrocytochrome c catalyzed by cytochrome c peroxidase // J. Biol. Chem. — 1966. — Vol. 241. — N 3. — P. 700–714.

Zimmerlin A., Wajtaszek P., Boiwell G.P. Synthesis of dehydrogenation polymers of ferulic acid with high specificity by a purified cell-wall peroxidase from french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // Biochem. J. — 1994. — Vol. 299. — N 3. — P. 747–753.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений и сокращений	3
Введение	5
Глава I. Гемсодержащие белки, катализирующие пероксидазные реакции	7
1.1. Структура и механизм действия гемсодержащих белков	7
1.2. Топография активных центров гемсодержащих белков	9
1.3. Участие гема в каталитическом процессе гемсодержащих белков	17
Глава II. Пероксидаза — катализатор биогенных систем	22
2.1. Строение пероксидазы	22
2.2. Механизм действия пероксидазы	32
2.2.1. Пероксидаза в реакциях пероксидазного окисления субстратов	33
2.2.2. Пероксидаза в реакциях пероксидазного окисления субстратов	36
2.2.2.1. Пероксидаза в реакциях индивидуального окисления субстратов	36
2.2.2.2. Пероксидаза в реакциях совместного окисления субстратов	42
2.3. Функциональная роль пероксидазы	44
2.4. Использование пероксидазы в аналитических исследованиях	50
Глава III. Пероксидаза в реакциях окисления медленно и быстро окисляемых субстратов	53
3.1. Кинетика окисления аскорбиновой кислоты	53
3.2. Кинетика совместного окисления двух медленно окисляемых субстратов пероксидазы (аскорбиновая кислота и ферроцианид калия)	57
3.3. Кинетика совместного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов пероксидазы (аскорбиновая кислота и гидрохинон)	62
3.4. Кинетика совместного окисления двух быстро окисляемых субстратов пероксидазы (<i>o</i> -дианизидин и гидрохинон)	65
3.5. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на реакции пероксидазного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов	70
3.5.1. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на реакции пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты	71
3.5.2. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на реакции пероксидазного окисления <i>o</i> -дианизидина и гидрохинона	73
3.6. Влияние низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновая кислота, кверцетин, дигоксин) на реакции пероксидазного окисления <i>o</i> -дианизидина	78

3.7. Фенотиазины (хлорпромазин, трифтазин, тиопроперазин) в пероксидазных реакциях	83
3.7.1. Пероксидазные реакции индивидуального и совместного окисления фенотиозинов	84
3.7.2. Влияние строфантина G на кинетику пероксидазного окисления фенотиозинов	90
3.8. Участие функционально активных веществ в пероксидазных реакциях	95
3.9. Функционально важные группы активного центра пероксидазы	103
3.9.1. Роль доступных карбоксильных групп пероксидазы в пероксидажном катализе	103
3.9.2. Спектрофотометрическое определение числа доступных карбоксильных групп в белках с помощью <i>o</i> -дианизидина и водорастворимого карбодиимида	112
3.9.3. Роль карбоксильных групп гемина в механизме действия пероксидазы	123
3.9.4. Ингибирование пероксидазы N-этиламидом <i>o</i> -сульфобензоилуксусной кислоты	125
3.10. Моно- и олигосахариды в механизме действия пероксидазы	130
3.10.1. Влияние моно- и олигосахаридов на каталитические свойства пероксидазы	132
3.10.2. Влияние моно- и олигосахаридов на стабильность пероксидазы	133
3.11. Динамическая модель активного центра пероксидазы	135
Глава IV. Антиоксидантная система растений и животных	144
4.1. Перекисное окисление липидов в живых организмах	144
4.2. Антиоксиданты биологических систем	150
Глава V. Роль пероксидазы в действии антиоксидантной системы растений	153
5.1. Индуцирование ультрафиолетовым облучением семян процессов перекисного окисления липидов в проростках пшеницы	156
5.2. Роль малых доз ультрафиолетового излучения на динамику активности ферментов зерновок пшеницы	164
5.3. Влияние малых доз ультрафиолетового облучения семян на состояние антиоксидантной системы прорастающих зерновок пшеницы	168
5.4. Влияние УФ-облучения зерновок на состояние антиоксидантной системы защиты проростков пшеницы	174
5.5. Взаимное влияние пероксидазы и низкомолекулярных антиоксидантов при прорастании зерновок пшеницы	183
5.6. Роль пероксидазы в иницировании механизмов прорастания зерновок пшеницы	195
Заключение	208
Литература	212



Рогожин Василий Васильевич — заведующий лабораторией исследования биологически активных веществ Якутской госсельхозакадемии, доктор биологических наук, профессор, заслуженный работник образования Республики Саха (Якутия), действительный член Нью-Йоркской академии наук.

Область научных интересов: окислительный стресс, гипобиоз высших растений, покой семян, стационарная ферментативная кинетика, пероксидазный катализ многокомпонентных систем.

Автор более 160 научно-методических работ

E-mail: vvrogozhin@mail.ru (vvrogozhin@msn.com)

<http://www.cassiavera.narod.ru>

(<http://www.vvrogozhin.yandex.ru>)

ISBN 5-901065-80-8



9 785901 065808